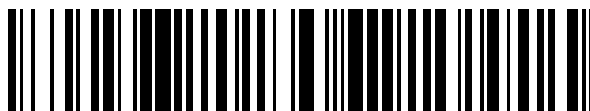


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 628**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2006 E 10179383 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2301969**

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

30 Prioridad:

06.05.2005 US 678918 P

01.07.2005 US 696251 P

26.08.2005 US 711600 P

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

29.02.2016

73 Titular/es:

ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)

1201 Eastlake Avenue East

Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es:

SIADAK, ANTHONY W.;

BILSBOROUGH, JANINE;

FLORKIEWICZ, ELIN;

HARAN, AARON C. y

RENE, SHIRLEY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 628 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 métodos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

10 El sistema inmune alberga una gran gama de determinados tipos de células incluyendo los linfocitos. Los linfocitos determinan la especificidad de la reacción inmune en un hospedador e incluyen dos clases, los linfocitos B, que son precursores de células que producen anticuerpos y los linfocitos T, que son necesarios para ciertas funciones de regulación, tales como el desarrollo de respuestas inmunes específicas.

15 Los linfocitos T maduros se pueden activar, es decir, con un antígeno u otro estímulo, para producir, por ejemplo, citoquinas, moléculas de señalización bioquímica, o receptores que influyen adicionalmente en el destino de la población de linfocitos T.

Los linfocitos B se pueden activar con receptores en su superficie celular que incluyen receptores de linfocitos B y otras moléculas auxiliares para realizar funciones celulares auxiliares, tales como producción de citoquinas.

20 Algunos monocitos/macrófagos y linfocitos T se pueden activar con receptores en su superficie celular y desempeñan un papel central en la respuesta inmune mediante la presentación de antígeno a linfocitos y también pueden actuar como células auxiliares para linfocitos mediante la secreción de numerosas citoquinas.

25 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) tienen una célula precursora común con los linfocitos T y los linfocitos B, y desempeñan un papel en la vigilancia inmune. Los linfocitos NK, que comprenden hasta un 15 % de linfocitos de la sangre, no expresan receptores antigénicos, y por lo tanto no usan reconocimiento de MHC como requisito para unión a una célula diana. Los linfocitos NK están implicados en el reconocimiento y la eliminación de ciertas células tumorales y células infectadas de forma vírica. *In vivo*, se cree que los linfocitos NK necesitan activación, *sin embargo, in vitro*, se ha mostrado que los linfocitos NK eliminan algunos tipos de células tumorales sin activación.

30 Las interleuquinas son una familia de citoquinas que median respuestas inmunológicas, incluyendo inflamación. Las interleuquinas median diversas patologías inflamatorias. Para una respuesta inmune son fundamentales los linfocitos T, que producen muchas citoquinas e inmunidad adaptativas con respecto a antígenos. Algunas citoquinas producidas por los linfocitos T se han clasificado como tipo 1 y tipo 2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76: 300-317, 1998). Las citoquinas de tipo 1 incluyen IL-2, IFN- γ , LT- α , y están implicadas en respuestas inflamatorias, inmunidad viral, inmunidad parasitaria intracelular y rechazo a aloinjerto. Las citoquinas de tipo 2 incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y están implicadas en respuestas humorales, inmunidad con respecto a helmintos y respuesta alérgica. Algunas citoquinas compartidas entre los Tipos 1 y 2 incluyen IL-3, GM-CSF y TNF- α . Existe una cierta evidencia para sugerir que algunas poblaciones de linfocitos T que producen Tipo 1 y Tipo 2 se desplazan preferentemente en diferentes tipos de tejido inflamado.

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

45 Se sabe que varias enfermedades de la piel expresan niveles elevados de linfocitos T CLA+ que incluyen dermatitis atópica, dermatitis por 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 común, prurito nodular, pénfigo bulloso. Existe una necesidad de tratamiento de tales enfermedades cutáneas mediadas por linfocitos T cutáneos.

50 Las actividades *in vivo* demostradas de la familia de las citoquinas ilustran el enorme potencial clínico de, y la necesidad de, otras citoquina, agonistas de citoquina y antagonistas de citoquina. La IL-31 es una citoquina recién identificada. Cuando la IL-31 se sobreexpresa en ratones, como resultado se tienen síntomas similares a los de la dermatitis. Tanto los linfocitos T buscadores cutáneos como los queratinocitos epidérmicos se han implicado en la patología de enfermedades cutáneas en seres humanos. La presente invención corrige estas necesidades al proporcionar antagonistas para citoquina IL-31 proinflamatoria. Tales antagonistas de la presente invención, que pueden bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de IL-31, incluyen receptores solubles de IL-31RA y anticuerpos anti-IL-31 de neutralización. La invención también proporciona usos de los mismos en enfermedades inflamatorias así como composiciones y métodos relacionados.

65 El documento de patente WO 03/060090 describe el ligando Zcytor17.

El documento de patente WO 2004/003140 describe multímeros de Zcytor17 receptores de citoquinas.

Dillon S.R. *et al.*, Nature Immunology, Vol. 5 (7) julio de 2004, páginas 752-760, informa que la IL-31, una citoquina producida por linfocitos T activados, induce dermatitis en ratones.

5 Dillon S.R. *et al.*, European Cytokine Network, Vol. 14, Suplemento 3, 1 de septiembre de 2003, página 81, informa que los ratones transgénicos que sobré expresan IL-31 desarrollan un fenotipo cutáneo prurítico grave que se parece a la dermatitis atópica.

Antes de exponer la invención con detalle, puede ser de ayuda a la comprensión de la misma para definir los siguientes términos:

10 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos de F(ab')₂ y Fab proteolíticos. También se incluyen anticuerpos o fragmentos intactos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos de Fv, anticuerpos de una sola cadena y similares, así
15 como péptidos y polipéptidos sintéticos que se unen a antígeno. Algunos anticuerpos no humanos se pueden humanizar mediante injerto de las CDR no humanas en regiones marco conservadas y constantes humanas o por incorporación de la totalidad de los dominios variables no humanos (opcionalmente "revistiéndolos" con una superficie similar a la humana mediante sustitución de restos expuestos, en los que se tiene como resultado un anticuerpo "revestido"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener restos no humanos dentro
20 de los dominios de la región marco conservada de la región variable humana para aumentar las características de unión apropiadas. A través de los anticuerpos humanizados, la vida media biológica se puede aumentar y el potencial de reacciones inmunes adversas después de su administración a seres humanos se reduce.

25 El término "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, por lo general mediante manipulación genética, a partir de genes de región variable y constante de inmunoglobulina 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 gamma 1 y gamma 3. Por lo tanto, un anticuerpo quimérico terapéutico habitual es una proteína híbrida formada por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque
30 se pueden usar otras especies de mamífero.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados básicamente por genes de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares
35 idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables en conjunto de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos)
40 están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) están codificadas del mismo modo por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente (aproximadamente 330 aminoácidos). Las cadenas pesadas se clasifican
45 como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, en la que la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase de manera general Fundamental Immunology (Paul, W., ed.,
50 2^a ed. Raven Press, N.Y., 1989), Capítulo 7.

Una inmunoglobulina de la región variable de cadena ligera o pesada consiste de una región "marco conservada" interrumpida por tres regiones hipervariables. Por lo tanto, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende
55 restos de aminoácidos de una "Región que Determina la Complementariedad" o "CDR" (es decir, los restos 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 cadena pesada (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 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 y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los restos de la "Región Marco Conservada" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de
60 la región hipervariable como se define en el presente documento. Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligera o pesada están relativamente conservadas dentro de una especie. Por lo tanto, una "región marco conservada humana" es una región marco conservada que es básicamente idéntica (aproximadamente un 85 % o más, normalmente un 90-95 % o más) con respecto a la región marco conservada de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región marco conservada de un anticuerpo, es decir, las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligera y pesada constitutivas, sirve para colocar y alinear las CDR.
65

Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno.

Por consiguiente, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco conservada humana y una o más CDR a partir de una inmunoglobulina no humana (normalmente una de ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "dadora" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina la "aceptora". No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero si lo están, deben ser básicamente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, idénticas al menos en aproximadamente un 85-90 %, preferentemente aproximadamente un 95 % o superior. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son básicamente 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 incluiría un anticuerpo quimérico habitual como se ha definido anteriormente, por ejemplo, debido a que la totalidad de la región variable de un anticuerpo quimérico no es humana.

La expresión "anticuerpos alterados genéticamente" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos ha variado en comparación con la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario estar confinado a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en anticuerpos naturales; los anticuerpos se pueden volver a diseñar para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y varían desde un cambio de solamente uno o de unos pocos aminoácidos hasta el nuevo diseño completo, por ejemplo, de la región variable o constante. En general, se realizarán cambios en la región constante con el fin de mejorar o alterar características tales como fijación de complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Se realizarán cambios en la región variable con el fin de mejorar las características de unión a antígeno.

Además de anticuerpos, pueden existir inmunoglobulinas en otras diversas formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos de una sola cadena o Fv, Fab, y (Fab')₂, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos polivalentes o multispecíficos (como se ha descrito anteriormente y con detalle en: Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426 (1988)). (Véase, por lo general, Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "Fv de una sola cadena", "anticuerpos de una sola cadena", "Fv" o "scFv" hacen referencia a fragmentos de anticuerpo que comprenden las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero que carecen de las regiones constantes, pero dentro de una sola cadena polipeptídica. Generalmente, un anticuerpo de una sola cadena comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. Algunos anticuerpos de cadena individual los analiza con detalle Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); véase también la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 88/01649 y los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 4.946.778 y 5.260.203. En realizaciones específicas, los anticuerpos de una sola cadena también pueden ser biespecíficos y/o humanizados.

Un "fragmento de Fab" está formado por una cadena ligera y el C.sub.H1 y regiones 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.

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

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

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados con métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como "aproximadamente" X o "de forma aproximada" X, se entenderá que el valor de X indicado es preciso hasta ± 10 %.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento del uso de anticuerpos como antagonistas para IL-31 inhibiendo de este modo la inflamación en general, y los síntomas de dermatitis y enfermedades pruríticas. La invención proporciona anticuerpos monoclonales (como se define en las reivindicaciones) para uso en el tratamiento de dermatitis atópica y enfermedades pruríticas como se describe adicionalmente en el presente documento. La IL-31 es una citoquina de linfocitos T recién descubierta que, cuando se sobreexpresa en ratones, da como resultado síntomas similares a los de la dermatitis. Véase también, Dillon, *et al.*, *Nature Immunol.* 5: 752-760, 2004. Tanto los linfocitos T buscadores cutáneos como los queratinocitos epidérmicos se han implicado en la patología de

enfermedades cutáneas en seres humanos. El ARNm de la IL-31 y la expresión de proteínas se limita a la población de linfocitos T CLA+ de buscadores cutáneos tanto en pacientes con dermatitis atópica (AD) como en individuos normales, aunque el análisis del receptor de IL-31, IL-31RA, con inmunohistoquímica (IHC) sugiere niveles ligeramente más elevados de expresión de IL-31RA en queratinocitos cutáneos en biopsias de piel de personas que padecen AD aguda y crónica en comparación con individuos normales.

IL-31 es el nombre HUGO para una citoquina que se ha descrito anteriormente como Zcytol7rlig en una solicitud de Patente de Estados Unidos publicada (Véase la publicación con número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Véase también, Dillon, *et al.*, Nature Immunol., mencionado anteriormente. El receptor heterodimérico para IL-31 también se describió en la publicación con número 20030224487 como zcytor17 (nombre HUGO, IL-31RA) que forma un heterodímero con el receptor beta OncostatinM (OSMRbeta). IL-31 se aisló de una biblioteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humana activadas (hPBCs), que se seleccionaron para CD3. CD3 es un marcador de superficie celular único para células de origen linfoide, en particular los linfocitos T. El polinucleótido y las secuencias de polipéptidos para la IL-31 humana se muestran en las SEC ID N^{os}: 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos para la IL-31 de murino se muestran en las SEC ID N^{os}: 10 y 11, respectivamente. Como se usa en el presente documento, el término IL-31 se refiere a IL-31 como se usa en la publicación de la Patente de Estados Unidos con número 20030224487, como se ha mostrado anteriormente. La secuencia de señal de secreción de IL-31 está formada por los restos de los aminoácidos 1 (Met) a 23 (Ala), y el polipéptido maduro está formado por los restos de los aminoácidos 24 (Ser) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N^o: 2). El análisis de secuenciación N-terminal adicional de la purificada IL-31 de linfocitos 293T presentaba un extremo N-terminal en el resto 27 (Leu) como se muestra en la SEC ID N^o: 2, con el polipéptido maduro formado por los restos de los aminoácidos 27 (Leu) a 164 (Thr) (como se muestra en la SEC ID N^o: 2).

La secuencia de polipéptidos para IL-31RA (receptor de IL-31) se muestra en la SEC ID N^o: 5, y la secuencia de polipéptidos para el receptor beta OncostatinM receptor (OSMRbeta) se muestra en la SEC ID N^o: 7.

Los receptores IL-31RA y OSMRbeta pertenecen a la subfamilia de receptores de citoquina de Clase I que incluye, pero no se limita 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 totalmente en la Solicitud de Patente PCT N^o US01/20484 del mismo solicitante (publicación de WIPO N^o WO 02/00721). El análisis de la distribución tisular del ARNm de la subunidad IL-31RA reveló expresión en subconjuntos activados de linfocitos T CD4+ y CD8+, monocitos CD14+, y expresión más débil en linfocitos B CD19+. Además, el ARNm estaba presente en líneas de células THP-1 monocíticas tanto en reposo como activadas (ATCC N^o TIB-202), U937 (ATCC N^o CRL-1593.2) y HL60 (ATCC N^o CCL-240).

La inhibición, neutralización, bloqueo de transducción de señales por los antagonistas IL-31 que se describen en el presente documento se pueden medir con una serie de ensayos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, algunos ensayos para medir una reducción de la proliferación incluyen ensayos para la reducción de un colorante tal como Alamar Blue™ (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (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 (que están disponibles en el mercado en Poly-sciences, Inc., Warrington, PA); ensayos de mitogénesis, tales como medida de la incorporación de ³H-timidina; ensayos de exclusión de colorante que usan, por ejemplo, negro de naftaleno o azul de tripano; absorción decolorante usando diacetil fluoresceína; y liberación de cromo. Véase, en general, Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3^a ed., Wiley-Liss, 1994. Además de lo mencionado anteriormente, véase la publicación de Patente de Estados Unidos publicada con número 20030224487, (Sprecher, Cindy *et al.*, 2003) para un ejemplo de células BaF3 que expresan IL-31RA y OSMRbeta de longitud completa.

En general, se predice que las citoquinas tienen una estructura de cuatro hélices alfa, con las hélices A, C y D siendo las más importantes en las interacciones de ligando-receptor, y están más altamente conservadas entre miembros de la familia. Haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos de IL-31 humana mostrada en la SEC ID N^o: 2, el alineamiento de la IL-31 humana, IL-3 humana, y las secuencias de aminoácidos de citoquina humana se predice que la hélice A de IL-31 se define con los restos de los aminoácidos 38-52; la hélice B con los restos de los aminoácidos 83-98; la hélice C con los restos de los aminoácidos 104-117; y la hélice D con los restos de los aminoácidos 137-152; como se muestra en la SEC ID N^o: 2. El análisis estructural sugiere que el bucle de A/B es largo, el bucle de B/C es corto y el bucle de C/D es largo. Esta estructura de bucle da como resultado una organización helicoidal arriba-arriba-abajo-abajo. Basándose en la estructura del haz de 4 hélices, los restos de cisteína dentro de IL-31 que están conservados corresponden a los restos de los aminoácidos 72, 133, y 147 de la SEC ID N^o: 2; y 74, 137, y 151 de la SEC ID N^o: 11 que se describen en el presente documento. La colocación coherente de la cisteína es la confirmación adicional de la estructura de haz de cuatro hélices. También altamente conservado en la IL-31 está el resto de Glu como se muestra en la SEC ID N^o: 2 en el resto 43. Estas hélices de IL-31 pueden ser dianas específicas para inhibición, reducción o neutralización por los anticuerpos que se describen en el presente documento para el bloqueo de los efectos de la señalización de IL-31 a través de su receptor homólogo.

Basándose en la comparación entre secuencias de IL-31 humanas y murinas se encontraron restos conservados en las regiones de las que se había predicho que codificaban las hélices alfa, C y D. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones polipeptídicas, dominios, motivos, restos y secuencias de IL-31 humana descritas en el presente documento son como se muestran en la SEC ID N°: 1. Estas hélices de IL-31 pueden ser

5 dianas específicas para inhibición, reducción o neutralización por los anticuerpos que se describen en el presente documento para el bloqueo de los efectos de la señalización de IL-31 a través de su receptor homólogo.

Aunque la hélice D esta relación de conservada entre la IL-31 humana y murina, la hélice C es la más conservada. Aunque ambas especies tienen aminoácidos ácidos predominantes en esta región, las diferencias pueden

10 representar especificidad de especies en la interacción entre IL-31 y su receptor, IL-31RA, que comprende receptores monoméricos, heterodiméricos o multiméricos. El bucle A/B y la hélice B de IL-31 están ligeramente conservados, y la hélice C a través del Bucle C/D en la hélice D es la más conservada entre especies; la conservación a través de esta región sugiere que es funcionalmente significativa. Las hélices D de la IL-31 humana y murina también están conservadas. Los antagonistas del receptor IL-31RA se pueden diseñar a través de

15 mutaciones dentro de la hélice D de IL-31. Estos pueden incluir truncamiento de la proteína del resto Thr156 (SEC ID N°: 2), o conservación de restos que confieren unión del ligando al receptor, pero que disminuyen la actividad de señalización.

Algunos métodos para preparar los polinucleótidos que codifican los anticuerpos que se describen en el presente documento (incluyendo ADN y ARN) se conocen bien en la técnica. El ARN total se puede preparar usando

20 extracción con isotiocianato de guanidinio seguido de aislamiento mediante centrifugación en gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18: 52-94, 1979). El ARN Poli (A)⁺ se prepara a partir de ARN total usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-12, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli(A)⁺ usando métodos conocidos. Como alternativa, el ADN genómico se puede aislar. A continuación, los

25 polinucleótidos que codifican anticuerpos de IL-31 se identifican y se aíslan, por ejemplo, mediante hibridación o PCR.

La secuencia de polinucleótidos para el ortólogo de ratón de IL-31 se ha identificado y se muestra en la SEC ID N°: 3. La secuencia madura para la IL-31 de ratón comienza supuestamente en Met₁, como se muestra en la SEC ID N°:

30 4, que correspondía Met₁, como se muestra en la SEC ID N°: 2, en la secuencia humana. El análisis tisular reveló que la expresión de la IL-31 de ratón se encuentra en testículos, cerebro, células CD90+, células de próstata, glándula salival y piel. El análisis de secuenciación N-terminal adicional de la IL-31 purificada de células 293T mostraba un extremo N-terminal en el resto 31 (Ala) como se muestra en la SEC ID N°: 4, con el polipéptido maduro formado por los restos de los aminoácidos 31 (Ala) a 163 (Cys) (como se muestra en la SEC ID N°: 4).

Se puede generar un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la secuencia de proteínas de IL-31, como se muestra en la SEC ID N°: 2 (Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. *Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986 y Triquier *et al.*, *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos de deslizamiento. Los restos ocultos de G, S, y T y los restos expuestos de H, Y, y W se ignoraron. Por ejemplo, en la

40 IL-31 humana, algunas regiones hidrófilas incluyen restos de los aminoácidos 54-59 de la SEC ID N°: 2, restos de los aminoácidos 129-134 de la SEC ID N°: 2, restos de los aminoácidos 53-58 de la SEC ID N°: 2, restos de los aminoácidos 35-40 de la SEC ID N°: 2, y restos de los aminoácidos 33-38 de la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, en la IL-31 de ratón, algunas regiones hidrófilas incluyen restos de los aminoácidos 34-39 de la SEC ID N°: 11, restos de los aminoácidos 46-51 de la SEC ID N°: 11, restos de los aminoácidos 131-136 de la SEC ID N°: 11, restos de los

45 aminoácidos 158-163 de la SEC ID N°: 11, y restos de los aminoácidos 157-162 de la SEC ID N°: 11.

Los expertos en la materia reconocerán que la hidrofilia o la hidrofobia se tendrán en cuenta cuando se diseñan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-31, con el fin de no alterar el perfil estructural y biológico general. Para la sustitución son de interés en particular algunos restos hidrófobos seleccionados entre el

50 grupo que consiste en Val, Leu e Ile o el grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, algunos restos que toleran la sustitución podrían incluir Val, Leu e Ile o el grupo que consiste en restos de Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp, como se muestra en la SEC ID N°: 2. Algunos restos conservados de cisteína en las posiciones dentro de la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 11, serán relativamente intolerantes a la sustitución.

La presente invención incluye anticuerpos monoclonales (como se definen las reivindicaciones) que unen fragmentos funcionales de polipéptidos de IL-31, y la memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico que codifican tales fragmentos funcionales. Una IL-31 "funcional" o fragmento de la misma, tal como se define en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad para inducir o

60 inhibir funciones celulares especializadas, o por su capacidad para unirse de forma específica a un anticuerpo anti-IL-31 o IRA de IL-3 o anticuerpo o heterodímeros de IL-31RA/OSMRbeta de estos receptores (ya sean solubles o inmovilizados). Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la IL-31 se caracteriza por una estructura de haces de cuatro hélices que comprende la hélice A (restos de los aminoácidos 38-52), hélice B (restos de los aminoácidos 83-98), hélice C (restos de los aminoácidos 104-117) y hélice D (restos de los aminoácidos 137-152), como se muestra en la SEC ID N°: 2. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que comprenden: (a) moléculas de polipéptidos que comprenden una o más de las hélices que se han

65 descrito anteriormente; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. La otra parte del

polipéptido de la proteína de fusión puede colaborar con otra citoquina de haz de cuatro hélices, tal como IL-15, IL-2, IL-4 y GM-CSF, o con un péptido de señal de secreción no nativo y/o uno sin relacionar que facilita la secreción de la proteína de fusión.

5 La presente memoria descriptiva describe anticuerpos que se unen a fragmentos de polipéptido o péptidos que comprenden una parte que porta epítipo de un polipéptido de IL-31 que se describe en el presente documento. Tales fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico", que es una parte de una proteína que provoca una respuesta del anticuerpo cuando toda la proteína se usa como un inmunógeno. Los péptidos que portan
10 epítipos inmunogénicos se pueden identificar usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998 (1983)). La unión de los anticuerpos a estos fragmentos funcionales a como resultado inhibición, bloqueo, neutralización, y/o reducción de la transducción de la señal de IL-31 en su receptor homólogo.

Por el contrario, los fragmentos de polipéptidos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico", que es una
15 región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo de forma específica. Ciertos epítipos consisten en un estiramiento de aminoácidos lineal o contiguo, y la antigenicidad de tal epítipo no se ve alterada por los agentes de desnaturalización. La técnica se sabe que algunos péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden imitar epítipos de una proteína se pueden para estimular la producción de anticuerpos frente a la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, Science 219: 660 (1983)). Por consiguiente, los péptidos y los polipéptidos que
20 portan epítipos antigénicos son útiles para aumentar los anticuerpos (por ejemplo, neutralización de anticuerpos) que se unen con los polipéptidos que se describen en el presente documento. Se pueden usar perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el potencial más antigénico (Hopp *et al.*, 1981, mencionado anteriormente y Hopp, 1986, mencionado anteriormente). Por ejemplo, en IL-31 humana, algunas regiones hidrófilas incluyen restos de los aminoácidos 54-59 de la SEC ID N°: 2, restos de los aminoácidos 129-134 de la SEC ID N°: 2,
25 restos de los aminoácidos 53-58 de la SEC ID N°: 2, restos de los aminoácidos 35-40 de la SEC ID N°: 2, y restos de los aminoácidos 33-38 de la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, en IL-31 de ratón, algunas regiones hidrófilas incluyen restos de los aminoácidos 34-39 de la SEC ID N°: 11, restos de los aminoácidos 46-51 de la SEC ID N°: 11, restos de los aminoácidos 131-136 de la SEC ID N°: 11, restos de los aminoácidos 158-163 de la SEC ID N°: 11, y restos de los aminoácidos 157-162 de la SEC ID N°: 11.

Algunos péptidos y polipéptidos que portan epítipos antigénicos contienen preferentemente al menos de cuatro a diez aminoácidos, al menos de diez a catorce aminoácidos, o de aproximadamente catorce a aproximadamente treinta aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 4. Tales péptidos y polipéptidos que portan epítipos se
35 puede producir mediante la fragmentación de un polipéptido de IL-31, o mediante síntesis química de péptidos, como se describe en el presente documento. Además, algunos epítipo se puede seleccionar mediante presentación de fagos de bibliotecas de péptidos aleatorios (véase, por ejemplo Lane y Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268 (1993); y Cortese *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616 (1996)). Algunos métodos convencionales para identificar epítipos y para producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítipo se describen, por ejemplo, en 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 y 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).

45 La actividad de los anticuerpos como se describe en el presente documento se puede medir por su capacidad para inhibir, o reducir la proliferación usando diversos ensayos que miren la proliferación de y/o unión a células que expresan el receptor IL-31RA. Son de interés en particular los cambios en las células dependientes de IL-31. Algunas líneas celulares adecuadas para su modificación con ingeniería la que dependen de IL-31 incluyen la línea de células BaF3 dependientes de IL-3 (Palacios y 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). Algunas líneas celulares dependientes de factor de crecimiento se pueden establecer de acuerdo con métodos 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).

55 La actividad de los anticuerpos anti-IL-31 que se describe en el presente documento se puede medir mediante un microfisiómetro con biosensor basado en silicio que mide la tasa de acidificación extracelular o excreción de protones asociada con la unión a receptor y posterior respuestas celulares fisiológicas. Un dispositivo modo de ejemplo es el Microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Con este método se pueden medir diversas respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte iónico, producción de
60 energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y receptora, y similares. Véase, por ejemplo, McConnell, 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, 1. *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998.

Algunos antagonistas también son útiles como reactivos de investigación para la caracterización de sitios de interacción de ligando-receptor. Algunos antagonistas útiles para inhibir la expansión, proliferación, activación, y/o
65 diferenciación de células implicadas en la regulación de la hematopoyesis. Algunos inhibidores de la actividad de IL-

31 (antagonistas de IL-31) incluyen anticuerpos anti-IL-31 y receptores de IL-31 soluble, así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

5 La inhibición de la actividad de IL-31 se puede medir con una serie de ensayos. Además de los ensayos que se desvelan en el presente documento, algunas muestras se pueden someter al ensayo para inhibición de la actividad de IL-31 dentro de diversos ensayos diseñados para medir la unión al receptor, la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de IL-31 o la proliferación de células que expresan el receptor IL-31RA.

10 Un polipéptido de unión a IL-31 también se puede usar para purificación de ligandos. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, tal como perlas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada, o materiales similares que son estables en las condiciones de uso. En la técnica se conocen algunos métodos para unir polipéptidos a soportes sólidos, e incluyen química de amina, activación de bromuro cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo, y activación de hidrazida. El medio resultante generalmente se configurará en forma de una columna, y los fluidos que contienen ligando se pasan a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. A continuación, el ligando se eluye usando cambios en la concentración de sal, agentes caotrópicos (guanidina HCl), o pH para alterar la unión de ligando-receptor.

20 De forma ventajosa se puede usar un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par de complemento/anti-complemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento biosensor disponible en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Tal receptor, anticuerpo, miembro de un par de complemento/anti-complemento de fragmentos se inmoviliza sobre la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento se desvela en 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 de forma covalente, usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que se unen a la película de oro dentro de la celda del flujo. Una muestra de ensayo se pasa a través de la célula. Si un ligando, epítipo, o miembro opuesto del par de complemento/anti-complemento está presente en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizados, respectivamente, causando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en resonancia de plasmones superficiales de la película de oro. Este sistema permite la determinación de 25 tasas de encendido y apagado, a partir de las que se puede calcular la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de unión. Como alternativa, la unión de ligando/receptor se puede analizar usando tecnología SELDI(TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA).

35 Los anticuerpos IL-31 se pueden usar para bloquear la acción biológica de la IL-31 proinflamatoria y son útiles como agentes terapéuticos antiinflamatorios en diversas enfermedades como se describe en el presente documento. Un experto en la materia reconocería que algunos polipéptidos que portan epítipo, antigénicos contienen una secuencia de al menos 6, preferentemente al menos 9, y más preferentemente al menos de 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de IL-31 (por ejemplo, SEC ID N°: 2). Están incluidos algunos polipéptidos que comprenden una parte más grande de un polipéptido de IL-31, es decir, de 30 a 100 restos hasta 40 toda la longitud de la secuencia de aminoácidos. Algunos antígenos o epitopos inmunogénicos también pueden incluir etiquetas unidas, adyuvantes, vehículos y excipientes, como se describe en el presente documento. Algunos antígenos adecuados incluyen el polipéptido de IL-31 codificado por la SEC ID N°: 2 del aminoácido número 24 al aminoácido número 164, o un fragmento de aminoácido contiguo de 9 a 141 del mismo. Otros antígenos adecuados incluyen, la IL-31 de longitud completa y la madura, las hélices A-D, y las hélices A, B, C, y D individuales o 45 múltiples, de la estructura de haz de cuatro hélices de IL-31, como se describe en el presente documento. Algunos péptidos preferentes para usar como antígenos son péptidos hidrófilos tales como los predichos por un experto en la materia a partir de la representación de hidrofobia, como se describe en el presente documento, por ejemplo, restos de los aminoácidos 114-119, 101-105, 126-131, 113-118, y 158-162 de la SEC ID N°: 2; y restos de los aminoácidos 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 y 157-162 de la SEC ID N°: 11. Además, algunos epitopos antigénicos de IL-31, como se predice en una representación de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando del programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) sirven como antígenos preferentes, y los determina fácilmente un experto en la materia.

55 Algunos anticuerpos a partir de una respuesta inmune generada por inoculación de un animal con estos antígenos se pueden aislar y purificar como se describe en el presente documento. En la técnica se conocen bien algunos métodos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Cooligan, *et al.* (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

60 Tal como sería evidente para un experto habitual en la materia, algunos anticuerpos policlonales se pueden generar a partir de la inoculación de diversos animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido de IL-31 o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido de IL-31 se puede aumentar a través del uso de un adyuvante, tal como alum (hidróxido de aluminio) o 65 adyuvante completo o incompleto de Freund. Algunos polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de IL-31 o una parte de los mismos con un polipéptido de

inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte del polipéptido es de "tipo hapteno", tal parte se puede unir o conectar de forma ventajosa a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para inmunización.

5 Se considera que algunos anticuerpos según en qué forma específica si: 1) presentan un nivel de umbral de actividad de unión, y 2) no reaccionan de forma significativa con moléculas de polipéptido relacionadas. Un nivel de umbral de unión se determina si los anticuerpos anti-IL-31 en el presente documentos se unen a un polipéptido, péptido o epitopo de IL-31 con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión con respecto al polipéptido de control (no IL-31). Es preferente que los anticuerpos presenten una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o superior, preferentemente $10^7 M^{-1}$ o superior, más preferentemente $10^8 M^{-1}$ o superior, y lo más preferentemente $10^9 M^{-1}$ o superior. La afinidad de unión de un anticuerpo la puede determinar fácilmente un experto habitual en la materia, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

15 Se muestra si algunos anticuerpos anti-IL-31 no se reaccionan de forma cruzada significativamente con moléculas de polipéptido relacionadas, por ejemplo, mediante la detección de anticuerpo del polipéptido de IL-31 pero polipéptidos relacionados no conocidos usando un análisis de transferencia de Western convencional (Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). Algunos ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos son los que se desvelan en la técnica anterior, tales como ortólogos conocidos, y parálogos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. También se puede realizar identificación sistemática usando IL-31 no humana, y polipéptidos mutantes de IL-31. Además, algunos anticuerpos se pueden "identificar de forma sistemática con respecto a" polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une de forma específica a los polipéptidos de IL-31. Por ejemplo, algunos anticuerpos producidos frente a IL-31 se adsorben a polipéptidos relacionados adheridos a matriz insoluble; algunos anticuerpos específicos con respecto a IL-31 fluirán a través de la matriz en las condiciones de tamponamiento apropiadas. La identificación sistemática permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no tienen reacción cruzada con respecto a polipéptidos estrechamente relacionados conocidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y 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). En la técnica se conoce bien la identificación sistemática y el aislamiento de anticuerpos específicos. Véase, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Algunos anticuerpos anti-IL-31 que se unen de forma específica se pueden detectar con una serie de métodos en la técnica, y que se desvelan a continuación.

35 Algunos anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, mediante inmunización de Ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), con el polipéptido de IL-31 humana recombinante maduro purificado (restos de los aminoácidos 27 (Leu) a 167 (Thr) de la SEC ID N°: 2) o el ortólogo de ratón, producido a partir de los sistemas de expresión que se enumeran en el presente documento. A cada una de las ratas se le proporciona una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 100 µg de la proteína IL-31 recombinante humana purificada en Adyuvante de Freund Completo (Pierce, Rockford, IL) seguido de inyecciones IP de refuerzo de 50 µg de la proteína recombinante purificada en Adyuvante de Freund Incompleto cada dos semanas. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, extrae sangre a los animales y el suero se recoge.

45 Las muestras de sueros de raza específicas para IL-31 humana se caracterizan mediante ELISA para la titulación con respecto a la IL-31 humana biotinilada diana de anticuerpo específico.

50 Las células de esplenocitos y de los nódulos linfáticos se recogen a partir de ratas de 2 títulos elevados y se fusionan con células de mieloma SP2/0 (ratón) usando PEG 1500 en dos procedimientos de fusión separados (proporción de fusión de 4:1, células de esplenocitos con respecto a mieloma, "Antibodies A Laboratory Manual, E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 10 días de crecimiento después de la fusión, los grupos de hibridoma que producen anticuerpo específico se identifican con ELISA. Los grupos de hibridoma positivos en ambos protocolos de ELISA se analizan adicionalmente para su capacidad para bloquear o reducir la actividad de unión a receptor ("ensayo de neutralización") de la IL-31 recombinante purificada.

55 Algunas combinaciones de hibridoma que proporcionan resultados positivos con ELISA solamente o ELISA y el "ensayo de neutralización" se clonan al menos dos veces mediante dilución limitante.

60 Algunos anticuerpos monoclonales purificados a partir de medios de cultivo tisular se caracterizan por su utilidad en un ELISA para la determinación cuantitativa de la IL-31 humana recombinante y nativa. Los anticuerpos se seleccionan y se desarrolla un ensayo cuantitativo.

65 Algunos anticuerpos monoclonales purificados a partir de medios de cultivo tisular se caracterizan por su capacidad para bloquear o reducir la actividad de unión al receptor ("ensayo de neutralización") de hIL-31 recombinante purificado en células BaF3/MPL-IL-31. De este modo se identifica un número de anticuerpos monoclonales "de neutralización". A continuación algunos hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales de neutralización con respecto a la IL-31 humana descritos se pueden depositar en el depósito de patentes de la Colección de

Americana de Cultivos Tisulares Tipo (ATCC; Manassas VA) como depósitos originales bajo el Tratado de Budapest.

Algunos anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante inmunización de Ratas de Lewis (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), con la proteína de fusión recombinante de IL-31 escindida y purificada. Ta cada
 5 una de las ratas se proporcionó una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 100 µg de la proteína de fusión recombinante purificada en Adyuvante de Freund Completo (Pierce, Rockford, IL) seguido de inyecciones IP de refuerzo de 50 µg de la proteína recombinante purificada en Adyuvante de Freund Incompleto cada dos semanas durante cuatro semanas. Después de las primeras cuatro semanas de inmunizaciones, se administran inyecciones IP de refuerzo de 50 µg de la proteína recombinante purificada escindida acoplada a la hemocianina de lapa
 10 californiana de proteína vehículo (KLH, Pierce, Rockford, IL) en Adyuvante de Freund Incompleto dos semanas durante cuatro semanas. De siete a diez días después de la administración de la cuarta inyección de refuerzo, se extrae sangre a los animales y el suero se recoge. Las muestras de suero de rata específicas para IL-31 se caracterizan mediante ELISA usando 500 ng/ml de la proteína de fusión recombinante purificada, IL-31-Fc, como la diana de anticuerpo específica y una proteína de fusión sin relacionar como la diana de anticuerpo no específica. La
 15 esplenocitos recogidos de una o más de las ratas con títulos elevados y se fusionan con células SP2/0 de mieloma (ratón) en un protocolo de fusión optimizado mediado con PEG (Rockland Immunochemicals). Después de 12 días de crecimiento después de la fusión, los grupos de hibridoma que producen anticuerpo específico se identifican mediante ELISA usando 500 ng/ml cada uno de la proteína de fusión recombinante de IL-31 purificada como la diana de anticuerpo específico y una proteína de fusión sin relacionar como una diana de anticuerpo no específico. Los
 20 grupos de hibridoma positivos para la diana de anticuerpo específico solamente se analizan adicionalmente para su capacidad para bloquear por reducir la actividad de unión al receptor ("ensayo de neutralización") de hIL-31 recombinante en células BaF3/MPL-IL-31 y una capacidad para unirse a través de análisis de FACS como diana de anticuerpo. Los grupos de hibridoma que proporcionan un resultado positivo específico en el ensayo de ELISA y resultados positivos en cualquiera de FACS o "ensayo de neutralización" se clonan al menos dos veces mediante
 25 dilución limitante.

Se generaron cinco hibridomas de anti-ratón de rata de una manera similar y se les proporcionaron las siguientes denominaciones del clon: clon 271.9.4.2.6, clon 271.26.6.6.1, clon 271.33.1.2.2, clon 271.33.3.2.1, y clon 271.39.4.6.5. Véase el Ejemplo 1. Los anticuerpos monoclonales producidos con estos clones se caracterizaron de
 30 un número de maneras que incluyen clasificación (es decir, la determinación de si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa, y neutralización. Parece que los anticuerpos monoclonales entran en dos clasificaciones separadas con el clon 271.33.3.2.1 que se une a un epítipo separado en lugar de los otros cuatro. La afinidad de unión relativa para cuatro de estos anticuerpos monoclonales se describe en el Ejemplo 14.

Se puede generar afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales. El anticuerpo específico de IgG-Fc gamma anti-Rata de Cabra (Jackson) se inmoviliza sobre un chip de CM5 Biacore. El ensayo se optimiza para unir cada
 35 mAb sobre la superficie de captura de anti-Rata y a continuación se indica una serie de concentración de IL-31 a través del mAb para ver la asociación (K_a) y disociación (K_d). Después de cada realización, la superficie se regenera de nuevo con respecto al Anticuerpo anti-Rata con 2 inyecciones de HCl 20 mM. Se generan datos para cada uno y se usa software de evaluación (software BIAevaluation en su versión 3.2, Pharmacia Biacore, Uppsala, Suecia) para
 40 evaluar la cinética del anticuerpo anti-IL-31 que se une a la proteína IL-31.

Se pueden generar mAb de IL-31 anti-humano de murino como sigue a continuación. Se inmunizan ratones supresión genética de IL-31 de seis a doce semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 25-50 µg de
 45 proteína IL-31-muFc humana soluble) mezclada a 1:1 (v:v) con adyuvante de Ribi (Sigma) en una programación dos veces a la semana. De siete a diez días después de la tercera inmunización, se extraen muestras de sangre a través de extracción retroorbital, el suero se recoge y se evalúa para su capacidad para inhibir la unión de IL-31 en ensayos de neutralización (por ejemplo, se describe en el presente documento) y para teñir IL-31 transfectar con respecto a células 293 sin transfectar en un ensayo de tinción de FACS. Se continuó inmunizando a los ratones ay se tomaron
 50 muestras de sangre y se evaluaron como se ha descrito anteriormente hasta que los títulos de neutralización alcanzan una meseta. En ese momento, los ratones con los títulos de neutralización más elevados se inyectan por vía intravascular con 25-50 µg de proteína IL-31-Fc soluble en PBS. Tres días más tarde, el bazo y los nódulos linfáticos de estos ratones se cosechan y se usan para generación de hibridoma, por ejemplo usando células de mieloma de ratón (P3-X63-Ag8.653.3.12.11) u otras líneas celulares apropiadas en la técnica, usando métodos
 55 convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Kearney, J.F. *et al.*, J Immunol. 123: 1548-50, 1979; y Lane, R.D. J Immunol Methods 81: 223-8, 1985).

Se puede realizar identificación sistemática primaria en los sobrenadantes del hibridoma a los 8-10 días después de la fusión para su capacidad para unirse a proteína de IL-31-muFc con ELISA usando reactivos de etapa de segunda
 60 cadena ligera kappa y anti-lambda anti-ratón de cabra conjugados con HRP para identificar anticuerpos de ratón unidos.

La confirmación bioquímica de que la molécula diana, IL-31, reconocida por los supuestos mAb anti-IL-31 es ciertamente IL-31 se realiza mediante inmunoprecipitación convencional seguida de análisis SDS-PAGE o
 65 procedimientos de transferencia de Western, usando ambos preparaciones de membrana soluble de células Baf3 transfectadas con respecto a Baf3 sin transfectar de IL-31. Los mAb se someten a ensayo por su capacidad para

inmunoprecipitar, de forma específica o mediante transferencia de Western, la proteína IL-31-muFc soluble.

5 Algunos anticuerpos monoclonales purificados a partir de medios de tisular se caracterizaron por su capacidad para bloquear o para inhibir la capacidad de IL-31 para unirse a su receptor en un ensayo de neutralización. De esta manera, se identificaron veinte anticuerpos monoclonales de "neutralización". Diez de éstos se han identificado como "buenos agentes de neutralización" después de la primera ronda de clonación: clon 292.118.6, clon 292.63.5, clon 292.64.6, clon 292.84.1, clon 292.109.4, clon 292.12.3, clon 292.51.5, clon 292.39.5, y clon 292.105.4. Los otros diez tienen las siguientes denominaciones del clon después de la primera ronda de clonación: clon 294.35.2, clon 294.146.5, clon 292.152.4, clon 292.154.4, clon 294.154.5, clon 294.35.3, clon 294.155.6, clon 294.158.5, clon 294.163.2, y clon 294.144.3.

15 Los anticuerpos monoclonales especificados se tomaron a través de una segunda ronda de clonación y, de nuevo, se caracterizaron por su capacidad para bloquear o inhibir la capacidad de IL-31 para unirse a su receptor en un ensayo de neutralización. Las denominaciones del clon después de la segunda ronda de clonación para los "buenos agentes de neutralización" son: clon 292.12.3.1, clon 292.63.5.3, clon 292.72.3.1, clon 292.84.1.6, clon 292.118.6.4, clon 292.64.6.5.5, clon 292.39.5.3, clon 292.511.5.2, clon 292.109.4.4, y clon 292.105.4.1. Seis de los otros diez tienen las siguientes denominaciones del clon: clon 292.152.4.1, clon 294.158.5.2, clon 294.32.2.6.3, clon 294.144.3.5, clon 294.154.5.3, y clon 294.163.2.1.

20 Algunos hibridomas que expresan los anticuerpos monoclonales de neutralización con respecto a la IL-31 humana se depositaron en el depósito de patentes de la Colección Americana de Cultivos Tisulares Tipo (ATCC; Manassas VA) como depósitos originales bajo el Tratado de Budapest y se les proporcionaron los siguientes N^{os} de Registro en la ATCC: clon 292.12.3.1 (Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.72.3.1 (Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.63.5.3 (Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.118.6.4 (Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 294.163.2.1 (Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.84.1.6 (Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 294.35.2.6.3 (Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 294.154.5.6 Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC); y clon 294.144.3.5 (Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC).

30 Un hibridoma que expresar los anticuerpos monoclonales de neutralización para IL-31 de ratón que se describen en el presente documento se depositó en el depósito de patentes de la Colección Americana de Cultivos Tisulares Tipo (ATCC; Manassas VA) como un depósito original bajo el Tratado de Budapest y se le proporcionaron los siguientes números de Registro en la ATCC: clon 271.26.6.6.1 (Denominación PTA-6874 del Depósito de Patentes de la ATCC).

40 Los anticuerpos monoclonales producidos con estos clones de hibridoma se pueden cultivar en un medio de Dulbecco modificado con Iscove al 90 % con L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, y Suelo del Clon I Fetal al 10 % (Hyclone Laboratories). Los clones se pueden propagar mediante cultivos de inicio a 2 X 10⁵ células/ml y manteniendo entre 1 X 10⁵ y 5 X 10⁵ células/ml a 37 °C y CO al 5-6 %. Las células se pueden adaptar a condiciones sin suero después de transferencias posteriores. Las células que se congelan se almacenan en suero al 90 %, DMSO al 10 % y se almacenan en fase vapor del congelador de nitrógeno líquido.

45 Algunos anticuerpos monoclonales en medios de cultivo tisular se caracterizan por su capacidad para bloquear, inhibir, prevenir, o reducir la unión al receptor cuando se cultivan en presencia de las proteínas humanas IL-31 recombinantes purificadas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales producidos con estos clones se caracterizaron de un número de maneras que incluyen clasificación (es decir, la determinación de si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa, y neutralización. Parece que los diez anticuerpos de buena neutralización están en la misma clasificación, con los otros anticuerpos monoclonales agrupándose en tres clasificaciones separadas. Además, ocho de los anticuerpos de buena neutralización tienen el IgG1 y los otros dos tienen el isotipo IgG2a.

55 Algunos anticuerpos monoclonales de sobrenadantes de hibridoma se capturaron usando Fc pAb anti murino de cabra y se midió la afinidad de unión aparente (CE₅₀) de la IL31 biotinilada. En estas condiciones del ensayo, los buenos agentes de neutralización tienen los valores de CE₅₀ más bajos y comparables ~4 ng/ml de Bt-IL31. La afinidad aparente de los agentes de neutralización débiles se extiende en un intervalo de ~10 ng/ml a 236 ng/ml de Bt-IL31.

60 Algunos anticuerpos monoclonales generados con los métodos que se describen en el presente documento se pueden someter a ensayo para neutralización mediante diversos métodos. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de luciferasa como se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos publicada (Véase la publicación con número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Además la neutralización se puede someter a ensayo midiendo una disminución de la producción de quimioquinas 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 mediante los modelos *in vivo* que se describen en el presente documento.

En una realización, los anticuerpos que se describen en el presente documento son fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno humano, e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, Fv unidos con disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden cualquiera de un dominio VL o VH. Algunos fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de una sola

- 5 cadena, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con toda o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}. En el presente documento también se describen fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}.
- 10 En otra realización, los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Algunos anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de la presente invención así como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J. Immunol. 147: 60-69 (1991); documentos de patente de Estados Unidos 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).

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos alterados genéticamente que son equivalentes de manera funcional con respecto a los anticuerpos que se han descrito anteriormente. Algunos anticuerpos modificados que proporcionan aumento de la estabilidad y/o eficacia terapéutica son preferentes. Es que inician algunos ejemplos de anticuerpos modificados incluyen aquellos que tienen sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, y una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no alteran ni de forma significativa ni perjudicial la utilidad de la unión al antígeno. Algunas sustituciones pueden variar a partir de cambio o modificación de uno o más restos de aminoácidos para completar el nuevo diseño de una región siempre y cuando se mantenga la utilidad terapéutica.

20 Algunos anticuerpos se pueden modificar después de la traducción (por ejemplo, acetilación, y fosforilación) o se pueden modificar de forma sintética (por ejemplo, la unión de un grupo de etiquetado).

Los anticuerpos alterados de forma genética también incluyen anticuerpos quiméricos que se derivan de los anticuerpos anti-IL-31. Los anticuerpos quiméricos comprenden una región variable derivada de un ratón o rata y una región constante derivada de un ser humano de modo que el anticuerpo quimérico tiene una vida media más larga y es menos inmunogénico cuando se administra a un sujeto humano. El método para preparar anticuerpos quiméricos se conoce en la técnica. Las regiones variables de estos anticuerpos se pueden conectar con una región constante de una IgG humana para formar el anticuerpo quimérico deseado.

Algunos anticuerpos anti-IL-31 alterados de forma genética e incluyen versiones humanizadas de los anticuerpos que se describen en el presente documento, como se define en las reivindicaciones. Algunos anticuerpos humanizados comprenden CDR de una inmunoglobulina dadora de ratón y regiones marco conservadas de cadena pesada y de cadena ligera de una inmunoglobulina aceptora humana. El método para preparar anticuerpos humanizados se desvela en los documentos de Patente de Estados Unidos N^{os} 5.301.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370. A continuación, las CDR de estos anticuerpos se pueden injertar en cualquier región marco conservada seleccionada, que se conocen en la técnica, para generar el anticuerpo humanizado deseado.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos del epítomo(s) o porción(es) de un polipéptido que se describe en el presente documento a los que reconocen o se unen de forma específica. El epítomo(s) o porción o porciones de polipéptido se pueden especificar como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante las posiciones N-terminal y C-terminal, por el tamaño en restos de aminoácidos contiguos, o se enumeran en las Tablas y en las FIGS. También se pueden excluir algunos anticuerpos que se unen de forma específica a cualquier epítomo o polipéptido que se describe en el presente documento. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma específica a polipéptidos que se desvelan en el presente documento, y permite la exclusión de los mismos.

La memoria descriptiva desvela anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de un anticuerpo monoclonal a un polipéptido que se describe en el presente documento. La inhibición competitiva se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, usando los ensayos de unión competitiva que se describen en el presente documento. En realizaciones preferentes, un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 % con respecto al polipéptido de la SEC ID N^o: 2 o SEC ID N^o: 4.

La memoria descriptiva describe anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de un anticuerpo a un epítomo de la invención como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para la determinación de la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos que se describen en el presente documento. En realizaciones preferentes, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión al epítomo en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 %.

Los anticuerpos que se describen en el presente documento incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que esa unión covalente no evita que el

anticuerpo genere una respuesta anti-idiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Con técnicas conocidas se puede realizar cualquiera de numerosas modificaciones químicas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos que se describen en el presente documento también incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen vidas medias (por ejemplo, vidas medias en suero) en un mamífero, preferentemente un ser humano, superiores a 15 días, preferentemente superiores a 20 días, superiores a 25 días, superiores a 30 días, superiores a 35 días, superiores a 40 días, superiores a 45 días, superiores a 2 meses, superiores a 3 meses, superiores a 4 meses, o superiores a 5 meses. El aumento de las vidas medias de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferentemente un ser humano, dan como resultado una titulación en suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo más elevada en el mamífero, y por lo tanto, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o reduce la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a administrar.

Se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen un aumento de las vidas medias *in vivo* mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos con aumento de las vidas medias *in vivo* mediante modificación (por ejemplo, sustitución, supresión o adición) de restos de aminoácidos que se identifican como implicados en la interacción entre el dominio de Fc y el receptor de FcRn (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N^{os} WO 97/34631 y WO 02/060919). Se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen un aumento de las vidas medias *in vivo* mediante unión a dichos anticuerpos o moléculas del polímero de fragmentos de anticuerpos tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). El PEG se puede unir a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un conector multifuncional ya sea a través de conjugación específica del sitio del PEG con el extremo N- o C-terminal de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o a través de grupos épsilon-amino presentes en restos de lisina. Se usa derivatización de polímero lineal o ramificado que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se controlará muy de cerca con SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar una conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de conjugados de anticuerpo-PEG, por ejemplo, mediante exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico.

Se entiende que los anticuerpos humanizados diseñados con el presente método pueden tener funciones adicionales conservativas de aminoácidos que básicamente no tienen efecto en la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Por sustitución conservativa se entiende combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

En la técnica se conocen bien algunos métodos para la humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, se han construido inmunoglobulinas humanizadas, incluyendo anticuerpos humanizados, por medio de ingeniería genética. La mayor parte de las inmunoglobulinas humanizadas que se han descrito anteriormente (Jones *et al.*, mencionado anteriormente; Verhoeyen *et al.*, mencionado anteriormente.; Riechmann *et al.*, mencionado anteriormente) están formadas por una región marco conservada que es idéntica a la región marco conservada de una cadena de inmunoglobulina humana en particular, el aceptor, y tres CDR de una cadena de inmunoglobulina dadora no humana. De forma específica, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de anticuerpo de especies no humanas que se unió al antígeno deseado que tiene una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana.

La presente memoria descriptiva describe criterios con los cuales se elige un número limitado de aminoácidos en la región marco conservada de una cadena de inmunoglobulina humanizada para que sea el mismo que el de los aminoácidos en las posiciones en el dado en lugar de en el aceptor, con el fin de aumentar la afinidad de un anticuerpo que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada.

Los anticuerpos de la presente invención se generan basándose en parte en el modelo en el que dos causas que contribuyen a la pérdida de la afinidad en medios anteriores de producción de anticuerpos humanizados (usando como ejemplos anticuerpos de ratón, la fuente de las CDR) son:

(1) Cuando las CDR de ratón se combinan con la región marco conservada humana, los aminoácidos en la región marco conservada cercana a las CDR se convierten en humanas en lugar de ratón. Sin pretender quedar ligado por la teoría, estos aminoácidos cambiados distorsiona ligeramente las CDR, porque crean fuerzas electrostáticas o hidrófobas diferentes tienen anticuerpos de ratón dado, y las CDR distorsionadas pueden no producir contactos tan eficaces con el antígeno como lo hacen con las CDR en el anticuerpo dador; y

(2) Los aminoácidos en el anticuerpo de ratón original que están próximos a, pero que no forman parte de, las CDR (es decir, aún forman parte de la región marco conservada), pueden producir contactos con el antígeno que contribuyen a la afinidad. Estos aminoácidos se pierden cuando el anticuerpo está humanizado, porque todos los

aminoácidos de la región marco conservada se hacen humanos.

Para evitar estos problemas, y para producir anticuerpos humanizados que tengan una afinidad muy fuerte con respecto a un antígeno deseado, la presente invención usa uno o más de los siguientes principios para diseñar
5 inmunoglobulinas humanizadas. Además, los criterios se pueden usar de forma individual, o cuando sea necesario en combinación, para conseguir la afinidad u otras características deseadas.

Un principio es que, como aceptor, se usa una región marco conservada de una inmunoglobulina humana en particular que es extraordinariamente homóloga con respecto a la inmunoglobulina dadora a humanizar, o se usa
10 una región marco conservada consenso de muchos anticuerpos humanos. Por ejemplo, la comparación de la secuencia de una región variable de cadena pesada (o ligera) de ratón frente a regiones variables de cadena pesada (o ligera) humana en un banco de datos (por ejemplo, el National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource) muestra que el alcance de la homología de diferentes regiones humanas varía en gran medida, por lo general de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60-70 %. Al elegir como la
15 inmunoglobulina aceptoras una de las regiones variables de cadena pesada (respectivamente ligera) humana que es la más homóloga con respecto a la región variable de cadena pesada (respectivamente ligera) de la inmunoglobulina dadora, pocos aminoácidos cambiarán al desplazarse desde la inmunoglobulina dadora a la inmunoglobulina humanizada. Por lo tanto, y de nuevo sin pretender quedar ligado por la teoría, se cree que existe una posibilidad más pequeña de cambio de un aminoácido cerca de las CDR que distorsiona su conformación. Además, la forma
20 general precisa de un anticuerpo humanizado que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada puede parecerse en mayor medida a la forma del anticuerpo dado, lo que también reduce la posibilidad de distorsión de las CDR.

Por lo general, como aceptor se elegirá una de las 3-5 secuencias de región variable cadena pesada con la mayor homología en una colección representativa de al menos aproximadamente 10 a 20 cadenas pesadas humanas distintas para proporcionar la región marco conservada de cadena pesada, y del mismo modo para la cadena ligera. Preferentemente se usará una de las 1-3 regiones variables con la mayor homología. La cadena de inmunoglobulina aceptoras seleccionada tendrá, de la forma más preferente, una homología de al menos aproximadamente un 65 %
25 en la región marco conservada con respecto a la inmunoglobulina dadora.

En muchos casos, se puede considerar preferente el uso de cadenas ligeras y pesadas del mismo anticuerpo humano como secuencias aceptoras, para estar seguro de que las cadenas ligeras y pesadas humanizadas producirán contactos favorables entre sí. En este caso, las cadenas pesadas y ligeras del dador se compararán solamente frente a cadenas de anticuerpos humanos cuya secuencia completa se conoce, por ejemplo, los anticuerpos Eu Lay, Pom, Wol, Sie, Gal, Ou y WEA (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente; en ocasiones, los últimos pocos aminoácidos de una cadena humana no se conocen y se deben deducir por homología con respecto a otros anticuerpos humanos). El anticuerpo humano se elegirá entre aquellos en los que las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada, tomadas en conjunto, son en general las que presentan mayor homología con respecto a las secuencias de la región variable de cadena más ligera y pesada dadora. En ocasiones se proporcionará un peso más elevado a la secuencia de cadena pesada. El anticuerpo humano elegido proporcionará a continuación secuencias aceptoras de cadena tanto ligera como pesada. En la práctica, a menudo se encuentra que el anticuerpo Eu humano servirá para desempeñar este papel.
30

De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba con respecto a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor se acepta a continuación, la región marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chotia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada en particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región marco conservada se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).
35

Independientemente de cómo se elija la inmunoglobulina aceptoras, se puede conseguir una afinidad más elevada mediante la selección de un número pequeño de aminoácidos en la región marco conservada de la cadena de inmunoglobulina humanizada para que sea la misma que la de los aminoácidos en las posiciones en el dador en lugar de en el aceptor. A menudo, algunos restos de la región marco conservada en las regiones marco conservadas humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo dador de CDR para alterar, preferentemente aumentar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de región marco conservada se identifican con métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los restos de CDR y de región marco conservada para identificar restos de región marco conservar a importantes para unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de región marco conservada diferentes en posiciones en particular. (Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, documento de Pat. de Estados Unidos N° 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades). Algunos anticuerpos se pueden humanizar usando diversas técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación de PCT WO 91/09967; documentos de Pat. de Estados Unidos N°s 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (documento EP 592.106; documento EP 519.596;
40

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 combinación de cadenas (documento de Pat. de Estados Unidos N° 5.565.332). Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (documento de Pat. de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que básicamente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Un segundo principio es que las siguientes categorías definen los aminoácidos que se pueden seleccionar a partir del dador. Preferentemente, en muchas o todas las posiciones del aminoácido en una de estas categorías, el aminoácido dador se puede seleccionar de hecho.

Categoría 1: La posición del aminoácido se encuentra en una CDR que se detiene en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente

Categoría 2: Si un aminoácido en la región marco conservada de la inmunoglobulina aceptora humana es diferente (es decir, "raro", que tal como se usa en el presente documento se refiere a un aminoácido que se produce en esa posición en menos de aproximadamente un 20 % pero normalmente en menos de aproximadamente un 10 % de secuencias de región V de cadena pesada (respectivamente ligera) humana en un banco de datos representativo), y si el aminoácido dador en esa posición es habitual para secuencias humanas (es decir, "como un", que tal como se usa en el presente documento indica un aminoácido que se produce en más que aproximadamente un 25 % pero normalmente más de aproximadamente un 50 % de las secuencias en un banco de datos representativo), entonces se puede seleccionar el aminoácido dador en lugar del aceptor. Este criterio ayudará a asegurar que un aminoácido no habitual en la región marco conservada humana no altera la estructura del anticuerpo. Además, mediante la sustitución de un aminoácido diferente con un aminoácido del anticuerpo dador que pasa a ser habitual para anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado se puede hacer menos inmunogénico. Todas las secuencias humanas de región variable de cadena ligera y pesada se agrupan respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homóloga siempre sí y que tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "raro" o "común" entre secuencias humanas, a menudo será preferente considerar solamente las secuencias humanas en el mismo subgrupo como la secuencia aceptora.

Categoría 3: En las posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las 3 CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido o aminoácidos en lugar del aminoácido aceptor. Es particularmente probable que estos aminoácidos interactúan con los aminoácidos en las CDR y, si se eligen entre el aceptor, para alterar las CDR del dador y para reducir la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit *et al.*, *Science*, 233, 747-753 (1986)) y la selección de estos aminoácidos a partir del dador puede ser deseable para mantener todos los contactos del antígeno que proporcionan afinidad en el anticuerpo original.

Categoría 4: Un modelo de 3 dimensiones, por lo general del anticuerpo dador original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR son próximos a las CDR y tienen una buena probabilidad de interacción con aminoácidos en las CDR mediante formación de enlace de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas posiciones de los aminoácidos, se puede seleccionar el aminoácido de la inmunoglobulina dadora en lugar del aminoácido de la inmunoglobulina aceptora. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio por lo general tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 unidades de ángstrom de algún átomo en las CDR y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de la CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las mencionadas anteriormente.

En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, los 3 ángstrom se miden entre sus núcleos, pero para los átomos que no forman un enlace, los 3 ángstrom se miden entre sus superficies de Van der Waals. Por lo tanto, en el último caso, los núcleos deben estar dentro de aproximadamente 6 ángstrom (3 + suma de los radios de Van der Waals) para los átomos que se pueden considerar capaces de interacción. En muchos casos, los núcleos estarán alejados en 4 o 5 a 6 .ANG. Para la determinación de si un aminoácido puede interactuar con las CDR, es preferente no considerar los últimos 8 aminoácidos de la CDR 2de cadena pesada como parte de las CDR, porque desde el punto de vista de la estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la región marco conservada.

Los aminoácidos en la región marco conservada que son capaces de interactuar con aminoácidos en las CDR, y que por lo tanto pertenecen a la Categoría 4, se pueden distinguir de otro modo. El área superficial a la que se puede acceder con disolvente de cada aminoácido de la región marco conservada se calcula de dos maneras: (1) en el anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética que consiste en el anticuerpo con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 ángstrom al cuadrado superior muestra que el acceso del aminoácido de la región marco conservada amino al disolvente está bloqueada al menos en parte por las CDR, y por lo tanto que el aminoácido está poniéndose en contacto con las CDR. El área superficial a la que se puede acceder con el disolvente de un aminoácido se puede calcular basándose en un modelo de 3 dimensiones de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16, 548 (1983) y Lee y Richards, *J. Mol. Biol.* 55, 379 (1971)). En ocasiones, algunos aminoácidos de la región marco conservada también pueden interactuar con las CDR indirectamente, al influir en la conformación de otro aminoácido de la región marco conservada que a su vez está en contacto con las CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región marco conservada son capaces de interactuar con las CDR en muchos anticuerpos (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987), Chotia *et al.*, *Nature* 342, 877 (1989), y Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215, 175 (1990)), en particular en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat, mencionado anteriormente), y por lo tanto estos aminoácidos por lo general estarán en la Categoría 4. Por lo general, algunas inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención incluirán aminoácidos dadores (cuando sean diferentes) en la categoría 4 además de estos. También es probable que los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada interactúen con las CDR. En todas estas posiciones numeradas, es preferente la elección del aminoácido dador en lugar del aminoácido aceptor (cuando sean diferentes) que estará en la inmunoglobulina humanizada. Por otro lado, en ocasiones ciertas posiciones que pueden estar en la Categoría 4 tales como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera se pueden elegir entre la inmunoglobulina aceptor sin pérdida de afinidad en la inmunoglobulina humanizada. Chotia y Lesk (mencionado anteriormente) definen las CDR de forma diferente a Kabat *et al.* (mencionado anteriormente). En particular, se define que la CDR1 incluye los restos 26-32. Por consiguiente, Riechmann *et al.*, (mencionado anteriormente) eligen estos aminoácidos de las inmunoglobulinas dadoras.

También es importante que algunos anticuerpos se humanicen con retención de afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, algunos anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos de tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Hay disponibilidad de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales en tres dimensiones de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar restos de FR y se pueden combinar a partir del receptor e importar secuencias de modo que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como aumento de afinidad hacia el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y en mayor medida en influir en la unión al antígeno. Por lo general, hay disponibilidad de programas informáticos para crear modelos de proteínas tales como anticuerpos y los expertos de la materia nos conocen bien (véase, Levy *et al.*, *Biochemistry*, 28, 7168-7175 (1989); Brucoleri *et al.*, *Nature*, 335, 564-568 (1988); Chotia *et al.*, *Science*, 233, 755-758 (1986)). Estos no forman parte de la invención. De hecho, dado que todos los anticuerpos tienen estructuras similares, las estructuras de anticuerpo conocidas, que están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven, se pueden usar si fuera necesario como modelos aproximados de otros anticuerpos. Se pueden usar programas informáticos disponibles en el mercado para presentar estos modelos en un monitor de ordenador, para calcular la distancia entre átomos, y para calcular la probabilidad de la interacción de diferentes aminoácidos (véase, Ferrin *et al.*, *J. Mol. Graphics*, 6, 13-27 (1988)).

Además de las y mencionadas anteriormente, que describen cuando se puede tomar un aminoácido en la inmunoglobulina humanizada del dador, ciertos aminoácidos en la inmunoglobulina humanizada no se pueden tomar ni del dador ni del aceptor, si a continuación entran en:

Categoría 5: Si el aminoácido en una posición dada en la inmunoglobulina dadora es "raro" para secuencias humanas, y el aminoácido en esa posición en la inmunoglobulina aceptor también es "raro" para secuencias humanas, como se ha definido anteriormente, entonces el aminoácido en esa posición en la inmunoglobulina humanizada se puede elegir para que sea algún aminoácido "habitual" en secuencias humanas. Una dirección preferente es el aminoácido que se produce lo más a menudo en esa posición en las secuencias humanas conocidas que pertenecen al mismo subgrupo que la secuencia aceptor.

Por lo general, algunos anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales con respecto a los anticuerpos de ratón o en algunos casos a los anticuerpos quiméricos para uso en terapia en seres humanos:

(1) Porque la porción efectora es humana, y puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruir las células diana de forma más eficaz mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)).

(2) El sistema inmune humano no debería reconocer como extraña la región marco conservada o región constante del anticuerpo humanizado, y por lo tanto la respuesta del anticuerpo frente a tal anticuerpo inyectado debería ser menor que la que se produce frente a un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

(3) Se ha informado que algunos anticuerpos de ratón inyectados tienen una vida media en la circulación humana mucho más corta que la vida media de anticuerpos normales (D. Shaw *et al.*, *J. Immunol.*, 138, 4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán supuestamente una vida media más similar a la de los anticuerpos humanos de origen natural, lo que permite que se administren dosis más bajas y menos frecuente.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe el diseño de anticuerpos humanizados que se producen mediante expresión de segmentos de ADN recombinante que codifican las CDR de cadena pesada y ligera de una

inmunoglobulina dadora capaz de unirse a un antígeno deseado, tal como IL-31 unido a segmentos de ADN que codifican regiones de región marco conservada humana aceptora.

5 Los segmentos de ADN por lo general incluirán adicionalmente una secuencia de ADN de control de expresión unida de forma operativa a las secuencias de codificación de inmunoglobulina humanizada, incluyendo regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas, pero también se pueden usar algunas secuencias de control para hospedadores procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para expresión con un nivel elevado de las secuencias de nucleótidos, y, si se desea, puede ir seguido de la recogida y purificación de las cadenas ligeras humanizadas, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión otras formas de inmunoglobulina (véase, S. Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979)).

15 Algunas secuencias de ADN de región constante humana se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de diversas células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véase, Kabat mencionado anteriormente y el documento WP87/02671). Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivan del mismo modo que anticuerpos monoclonales capaces de unirse al antígeno predeterminado, IL-31, y se producen con métodos bien conocidos en cualquier fuente de mamífero conveniente que incluye ratones, ratas, conejos, o otros vertebrados capaces de producir anticuerpos. Algunas células de fuentes adecuadas para la región constante y secuencias de ADN de región marco conservada, y células hospedadoras para expresión y secreción de inmunoglobulina, se pueden obtener a partir del número de fuentes, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", sexta edición (1988) Rockville, Md. U.S.A.).

25 Además de las inmunoglobulinas humanizadas que se describen específicamente en el presente documento, otras inmunoglobulinas modificadas "básicamente homólogas" con respecto a las secuencias nativas se pueden diseñar y preparar fácilmente usando diversas técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia. Se pueden usar diversas regiones marco humanas diferentes, conservadas de forma individual o en combinación con una base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden conseguir fácilmente con diversas técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase, Gillman y Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979) y S. Roberts *et al.*, *Nature*, 328, 731-734 (1987)).

35 Algunos anticuerpos humanizados incluyen fragmentos así como anticuerpos intactos. Por lo general, estos fragmentos compiten con el anticuerpo intacto a partir del que se derivaron para unión al antígeno. Los fragmentos por lo general se unen con una afinidad de al menos 10^7 M⁻¹, y de forma más general 10^8 o 10^9 M⁻¹ (es decir, dentro de los mismos intervalos que el anticuerpo intacto). Algunos fragmentos de anticuerpo humanizado incluyen Fab, Fab' F(ab')₂, y Fv de cadenas pesadas y cadenas ligeras separadas. Algunos fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

40 Para detalles adicionales con respecto a humanización de anticuerpos, véanse los documentos de Patente Europea N^{os} EP 239.400, EP 592.106, y EP 519.596; los documentos de Publicación Internacional N^{os} WO 91/09967 y WO 93/17105; los documentos de Pat. de Estados Unidos 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: 10678-10684; Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Sup): 5973s-5977s; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-1722; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-410; Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-973; 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.

55 Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de 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*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente con células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de bibliotecas de fago de anticuerpo que se han analizado anteriormente. Como alternativa, algunos fragmentos de Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar de forma química para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, algunos fragmentos de F(ab')₂ se pueden aislar directamente a partir de cultivo de célula hospedadora recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para una persona con experiencia. Además, algunos ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de una sola cadena y anticuerpos incluyen los que se describen en los documentos de Pat. de Estados Unidos N^{os} 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).

65 La presente memoria descriptiva describe anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados de forma

química (incluyendo conjugaciones de forma tanto covalente como no covalente) a un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente al menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. Por lo tanto, la memoria descriptiva describe inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo que se describe en el presente documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados de forma química (incluyendo conjugaciones de forma tanto covalente como no covalente) a un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente al menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, pero se puede producir a través de secuencias conectoras. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de polipéptidos (o porción de los mismos, preferentemente al menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden usar para dirigir polipéptidos a tipos de células en particular, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mediante la fusión a la conjugación de polipéptidos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular en particular. Algunos anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos también se pueden usar en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Harbor *et al.*, mencionado anteriormente, y la publicación de PCT WO 93/21232; el documento EP 439.095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39: 91-99 (1994); documento de Pat. de Estados Unidos N° 5.474.981; Gillies *et al.*, PNAS 89: 1428-1432 (1992); Fell *et al.*, J. Immunol. 146: 2446-2452 (1991).

La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden polipéptidos (por ejemplo, los que comprenden un epítipo inmunogénico o antigénico) fusionados o conjugados con secuencias de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, dominios de anticuerpos distintos de las regiones variables). Por ejemplo, un polipéptido se puede fusionar o conjugar con una región de Fc del anticuerpo, o porción del mismo. Por ejemplo, algunos polipéptidos (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos), se pueden fusionar con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o porciones de los mismos (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, o cualquier combinación de los mismos y porciones de los mismos, dando como resultado polipéptidos quiméricos. La porción de anticuerpo fusionado con un polipéptido puede comprender la región constante, región bisagra, dominio C_{H1}, dominio C_{H2}, y dominio C_{H3} o cualquier combinación de todos los dominios o porciones de los mismos. Los polipéptidos también se prevé fusionar o conjugar con las porciones de anticuerpos mencionadas anteriormente para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones de Fc fusionadas con los polipéptidos que se desvelan en el presente documento pueden formar dímeros a través de enlace disulfuro entre las porciones de Fc. Algunas formas multiméricas de mayor tamaño se pueden preparar fusionando los polipéptidos con porciones de IgA e IgM. En la técnica se conocen algunos métodos para la fusión o la conjugación de polipéptidos con porciones de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, los documentos de Pat. de Estados Unidos N°s 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; EP 307,434; EP 367,166; las publicaciones de 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 modo de otro ejemplo una limitante, algunos polipéptidos que se describen en el presente documento, y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos varían desde los mismos) se pueden fusionar con albúmina (que incluyen, pero no se limitan a albúmina de suero humano recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, el documento de Pat. de Estados Unidos N° 5.876.969, presentado el 2 de marzo de 1999, el documento de Patente EP N° 0 413 622, y el documento de Pat. de Estados Unidos N° 5.766.883, presentado el 16 de junio de 1998). Los polipéptidos que se describen en el presente documento y/o anticuerpos de la presente invención (incluyendo fragmentos o variantes de los mismos), se pueden fusionar con cualquiera del extremo en la posición N- o C-terminal de la proteína heteróloga (por ejemplo, polipéptido de Fc de inmunoglobulina o polipéptido de albúmina de suero humano). En el presente documento se describen polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión.

Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos se pueden fusionar o conjugar con las porciones de anticuerpos mencionadas anteriormente para aumentar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando de todos conocidos en la técnica. Además, los polipéptidos se pueden fusionar o conjugar con las porciones de anticuerpos mencionadas anteriormente para facilitar la purificación. Un ejemplo informado describe proteínas químicas que consisten en los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las presiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero. (Véase, por ejemplo, el documento EP 394.827; Trauneker *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988)). El aumento de la administración de un antígeno a través de la barrera epitelial con respecto al sistema inmune se ha demostrado para antígenos (por ejemplo, insulina) conjugados con un asociado de unión a FcRn tales como fragmentos de IgG o Fc (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). Los polipéptidos fusionados o conjugados con un anticuerpo que tiene estructuras dimericas unidas por disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas distintas de la proteína monomérica secretada o fragmento de proteína solo. (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)). En muchos casos, la parte de Fc en una proteína de fusión es beneficiosa en terapia y diagnóstico, y por lo tanto puede dar como resultado, por ejemplo, aumento de las propiedades farmacocinéticas. (documento de patente EP A 232.262). Como alternativa, la supresión de la parte de Fc después de la proteína de fusión se ha expresado, detectado y purificado, si se desea. Por ejemplo, la parte de Fc puede impedir la terapia y diagnóstico si la proteína de fusión se usa como un antígeno

para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, algunas proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado con partes de Fc para la finalidad de ensayos de identificación sistemática 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) 0. Tales técnicas también incluyen, pero no se limitan a, el uso de agentes de conjugación bifuncionales (véase por ejemplo, los documentos de Pat. de Estados Unidos N^{os} 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, algunos polipéptidos (por ejemplo, los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos) se pueden fusionar consecuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación. Algunos ácidos nucleicos que codifican polipéptidos (que incluyen, pero no se limitan a ácido suplico se codifican epítomos inmunogénicos y/o antigénicos) también se pueden combinar con un gen de interés como una etiqueta de epítomo (por ejemplo, la etiqueta de hemaglutinina ("HA") o etiqueta de señalización) para ayudar en la detección y purificación del polipéptidos expresado. En realizaciones preferentes, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Tal como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos útiles para purificación incluyen, pero no se limitará, la etiqueta de "HA", que corresponde a un epítomo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)) y la etiqueta de "señalización".

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o evolución de un tumor como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un tratamiento dado, diagnóstico, detección, y/o régimen de prevención. La detección se puede facilitar por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Algunos ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, el documento de Pat. de Estados Unidos N^o 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como agentes de diagnóstico como se describe en el presente documento. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; algunos ejemplos de complejos del grupo prostético incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; algunos ejemplos de materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; algunos ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y algunos ejemplos de material reactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In o ⁹⁹Tc.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un guión metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos 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-desdihrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, no se debe interpretar que el agente terapéutico o resto de fármaco está limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, modificado desde la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Algunos anticuerpos también se pueden unir a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Algunas técnicas para la conjugación de tal resto terapéutico anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª 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 Preparación And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

Como alternativa, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como lo describe Segal en el documento de Pat. de Estados Unidos N° 4.676.980.

15 Un anticuerpo, con o sin un resto terapéutico conjugado al mismo, administrado solo o en combinación con factor o factores citotóxicos y/o citoquina o citoquinas se puede usar como un agente terapéutico.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para uso en dirección previa al tumor en tumor en la que se administra el conjugado de anticuerpo-receptor al paciente, seguido de eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de eliminación y a continuación administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

Diversos ensayos conocidos por los expertos en la materia se puede usar para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos de IL-31. Algunos ensayos a modo de ejemplo se describen con detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Algunos ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis simultánea, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), ensayo de transferencia puntual o transferencia de Western, ensayo de inhibición o competición, y ensayo de sándwich. Además, algunos anticuerpos se pueden cribar para unión a la proteína o polipéptido de IL-31 de tipo silvestre con respecto a mutante.

Se pueden usar algunos anticuerpos para IL-31 para etiquetado de células que expresan IL-31; para aislamiento de IL-31 mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para la determinación de niveles en circulación de polipéptidos de IL-31; para detección o cuantificación de IL-31 soluble como un marcador de patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos que usan FACS; para identificación sistemática de bibliotecas de expresión; a la generación de anticuerpos antiidiotipos; y como agentes de neutralización o como antagonistas para bloquear la actividad de IL-31 *in vitro* e *in vivo*. Algunas marcas o etiquetas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; algunas marcas o etiquetas indirectas pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como agentes intermedios. En el presente documento, algunos anticuerpos también se pueden conjugar directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados se pueden usar para diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Además, algunos anticuerpos para IL-31 o fragmentos de los mismos se pueden usar *in vitro* para detectar IL-31 desnaturalizada o fragmentos de la misma en ensayos, por ejemplo, Transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Algunas 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 se pueden unir directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas de bacterias o plantas (por ejemplo, difteria, toxina, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o ytrio-90 (ya sea unidos directamente al polipéptido o anticuerpo, o unidos indirectamente a través de medios de un resto de quelación, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos también se pueden conjugar con fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la 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 el que el otro miembro se une a la porción de polipéptido o anticuerpo. Para estos fines, el par biotina/estreptavidina es un par complementario/anticomplementario a modo de ejemplo.

Algunos polipéptidos de unión también pueden actuar como "antagonistas" de IL-31 para bloquear la unión de IL-31 y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*. Estos polipéptidos de unión anti-IL-31 serían útiles para inhibir la actividad de IL-31 o la unión de proteínas.

Algunas proteínas de fusión de polipéptido-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo-toxina se pueden usar para inhibición o ablación celular o tisular dirigida (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerígenos). Como alternativa, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a receptor, además del dominio de dirección), una proteína de fusión que incluye solamente el dominio de

dirección puede ser adecuada para la dirección de una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria para un tipo de célula o tejido de interés. En los casos en los que el dominio solamente de proteína de fusión incluye una molécula complementaria, la molécula anti-complementaria se puede conjugar con una molécula detectable o citotóxica. Tales proteínas de fusión de molécula complementaria de dominio representan de este modo un excipiente o vehículo genéricos de dirección para administración específica de célula/tejido de conjugados de molécula genérica detectable de anti-complementariedad/citotóxica.

En otra realización, las proteínas de fusión de anticuerpo IL-31-citoquina se pueden usar para eliminación *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, leucemia, linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cánceres de piel, sangre y médula ósea, o otros cánceres en los que se expresan los receptores de IL-31) (Véase, por lo general, Hornick *et al.*, Blood 89: 4437-47, 1.997). Las proteínas de fusión descritas permiten la dirección del anticuerpo a un sitio de acción deseado, proporcionando de este modo una concentración local elevada de anticuerpo. Algunos polipéptidos de IL-31 o anticuerpos anti-IL-31 adecuados se dirigen a una célula o tejido no deseado (es decir, un tumor o una leucemia), y el aumento de la lisis de célula diana dirigida mediada por citoquina fusionada mediante células efectoras. Algunas citoquinas adecuadas para esta finalidad incluyen interleuquina 2 y factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.

En otra realización más, si el polipéptido IL-31 o anticuerpo anti-IL-31 se dirige a células o tejidos vasculares, tal polipéptido o anticuerpos se puede conjugar con un radionúclido, y en particular con un radionúclido de emisión beta, para reducir la reestenosis.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden medir por su capacidad para inhibir, bloquear, o neutralizar el ligando IL-31 tal como se determina con diversos modelos *in vivo* conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento, que incluyen, pero no se limitará, el modelo de NC/Nga, el modelo epicutáneo de Ova, el modelo de hipersensibilidad crónica, y el modelo de hapteno crónico.

Tanto los linfocitos T buscadores cutáneos como los queratinocitos epidérmicos se han visto implicados en la patología de enfermedades cutáneas en seres humanos. El ARNm de IL-31 y la expresión de proteínas están limitados a la población de linfocitos T CLA+ buscadores cutáneos en seres humanos. Como tal, un antagonista para IL-31, que incluye un anticuerpo o antagonista receptor será útil en el tratamiento de enfermedades de la piel y epidérmicas que tienen expresión de linfocitos T CLA +. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, virus trópicos para la piel y prurito asociado a virus, vitiligo, linfoma de linfocitos T cutáneos, alopecia aerata, acné rosácea, acné común, prurito nodular, y pénfigo bulloso. Los marcadores de quimioquinas tales como TARC y MDC son útiles para medir el efecto de un anticuerpo monoclonal de neutralización con respecto a IL-31. Como se muestra en el Ejemplo 15, los efectos inhibitorios del tratamiento con anticuerpos anti-IL-31 que se describen en el presente documento se pueden medir mediante el control de los niveles de TARC y MDC.

Dermatitis por contacto

La dermatitis por contacto alérgica se define como una reacción inmune a un antígeno mediada por linfocitos T que entra en contacto con la piel. Se considera que la población de linfocitos T CLA+ está implicada en el inicio de la dermatitis ya que algunas respuestas de los linfocitos T dependientes de alérgenos están limitadas en gran medida a la población de células CLA+ (Véase Santamaria-Babi, L.F., *et al.*, J Exp Med: 181, 1935, (1995)). Los datos recientes han encontrado que solamente los linfocitos T CD4+ CLA+ de memoria (CD45RO+) y no los CD8+ proliferan y producen citoquinas tanto de tipo 1 (IFN-) como de tipo 2 (IL-5) como respuesta al níquel, un alérgeno de hipersensibilidad por contacto común. Además, las células que expresan CLA en combinación con CD4, CD45RO (memoria) o CD69 aumentan después de la estimulación específica con níquel y expresan los receptores de quimioquinas CXCR3, CCR4, CCR10 pero no CCR6. Véase Moed H., *et al.*, Br J Dermatol: 51, 32, (2004).

En modelos animales, se ha demostrado que la dermatitis alérgica por contacto depende de los linfocitos T y que los linfocitos T sensibles a la alergia se desplazan al sitio de la aplicación del alérgeno. Por lo general véase: Engeman T.M., *et al.*, J Immunol: 164, 5207, (2000); Ferguson T.A. y Kupper T.S. J Immunol: 150, 1172, (1993); y Gorbachev A.V. y Fairchild R.L. Crit Rev Immunol: 21, 451 (2001). Dado que los linfocitos T CLA+ producen IL-31 y la estimulación de IL-31 de queratinocitos cutáneos puede inducir quimioquinas proinflamatorias, tales como TARC y MDC, la IL-31 puede estar implicada en la patofisiología de la dermatitis por contacto. Mediante el uso de un anticuerpo IL-31 de neutralización en un modelo de ratón de hipersensibilidad por contacto. Véase el Ejemplo 8.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para aumentar los resultados clínicos de la Hipersensibilidad por Contacto mediante inhibición, reducción, neutralización, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picores asociados con la enfermedad.

Dermatitis Atópica

La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad cutánea inflamatoria de recaída crónica con un aumento radical de la incidencia durante las últimas décadas. La AD clínicamente se caracteriza por placas altamente pruríticas a menudo excoりadas y pápulas que muestran un transcurso de recaída crónica. El diagnóstico de la AD se basa principalmente en los hallazgos clínicos principales y secundarios. Véase Hanifin J.M., Arch Dermatol: 135, 1551 (1999). La histopatología revela espongiosis, hiperparaqueratosis paraqueratosis focal en lesiones agudas, mientras que las evidencias de lesiones crónicas son la hiperplasia epidérmica notable con hiper y paraqueratosis, acantosis/hipergranulosis e infiltración perivascular de la dermis con linfocitos y abundantes mastocitos.

Los linfocitos T desempeñan un papel fundamental en el inicio de las respuestas inmunes locales en tejidos y la evidencia sugiere que los linfocitos T de infiltración cutánea en particular, pueden desempeñar un papel fundamental en el inicio y mantenimiento de respuestas inmunes desreguladas en la piel. Aproximadamente un 90 % de los linfocitos T de infiltración en sitios inflamatorios cutáneos expresan el Ag asociado con linfocitos cutáneos (CLA+) que se une a 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 aumento significativo de los linfocitos T CLA+ en circulación entre pacientes con AD en comparación con individuos de control se ha documentado (Véase Teraki Y., *et al.*, Br J Dermatol: 143, 373 (2000), aunque otros han demostrado que los linfocitos T CLA+ de memoria de pacientes con AD responden preferentemente a extracto de alérgeno en comparación con la población de CLA- (Véase Santamaria-Babi, L.F., *et al.*, J Exp Med: 181, 1935, (1995)). En seres humanos, la patogénesis de trastornos atópicos de la piel se ha asociado con aumentos en los linfocitos T CLA+ que expresan aumento de niveles de citoquinas de tipo Th-2 tales como IL-5 y IL-13 9, 10. Véase Akdis M., *et al.*, Eur J Immunol: 30, 3533 (2000); y Hamid Q., *et al.*, J Allergy Clin Immunol: 98, 225 (1996).

Algunos ratones NC/Nga desarrollan de forma espontánea de lesiones similares a las de la AD que son paralelas a las de la AD humana en muchos aspectos, incluyendo el transcurso y signos clínicos, histopatología e inmunopatología cuando se alojan en condiciones sin patógenos no especificadas (no SPF) a aproximadamente 6-8 semanas de edad. Por el contrario, los ratones NC/Nga mantenidos en condiciones SPF no desarrollan lesiones cutáneas. Sin embargo, el inicio de las lesiones cutáneas espontáneas y comportamiento de rascado se puede sincronizar en ratones NC/Nga alojados en una instalación SPF mediante inyección intradérmica semanal de antígeno de ácaros del polvo en bruto. 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 nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de AD.

Además del modelo de NC/Nga de AD espontánea, la sensibilización epicutánea de ratones usando OVA también se puede usar como un modelo para inducir adelgazamiento epidérmico y dérmico dependiente de antígeno con un infiltrado mononuclear en la piel de ratones sensibilizados. Esto normalmente coincide con niveles elevados en suero de IgE total y específica, sin embargo, en este modelo no se produce ninguna disfunción de la barrera cutánea ni prurito. Véase Spergel J.M., *et al.*, J Clin Invest; 101: 1614, (1998). Este protocolo se puede modificar con el fin de inducir desregulación de la barrera cutánea mediante la sensibilización de ratones transgénicos para DO11.10 OVA TCR con OVA. El aumento del número de linfocitos T específicos de antígeno que podrían reconocer el antígeno de sensibilización puede aumentar el nivel de información en la quinta en comportamiento de raspado visible y liquenificación/descamación de la piel.

Tanto el modelo de AD espontánea en NC/Nga como el modelo de DO11.10 epicutáneo de OVA se usan para investigar la expresión de IL-31 y IL-31RA en AD, así como la capacidad de los anticuerpos que se describen en el presente documento para inhibir, reducir como neutralizar los efectos de IL-31. Véanse los Ejemplos 9 y 10 en el presente documento. en un estudio que usa el modelo de NC/Nga *in vivo* (Ejemplo 10), la administración de anticuerpos IL-31 de rata anti-ratón mostraba una reducción del tipo, pero no una reducción de la dermatitis. Los anticuerpos que se describen en el presente documentos útiles para inhibir el picor asociado con la dermatitis y enfermedades pruríticas que incluyen dermatitis atópica, prurito nodular, y eccema. Una inhibición, reducción, o prevención de picor, solamente, pueden ser eficaces para el tratamiento de enfermedades pruríticas que incluyen, pero no se limitan a, dermatitis atópica, prurito nodular, y eccema, ya que la detención del picor parará la evolución de la dermatitis, cuyo desarrollo depende del rascado.

Algunos modelos adicionales para medir los efectos inhibitorios de los anticuerpos anti-IL-31 que se describen en el presente documento se describen en Umeuchi, H. *et al.*, European Journal of Pharmacology, 518: 133-139, 2005; y en Yoo, J. *et al.*, J. Experimental Medicine, 202: 541-549, 2005.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 con los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar los resultados clínicos de dermatitis y enfermedades pruríticas que incluyen dermatitis atópica, prurito nodular, y eccema mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con enfermedad.

Reacciones alérgicas cutáneas de tipo retardado inducidas con fármacos

Las reacciones alérgicas cutáneas de tipo retardado inducidas por fármacos son muy heterogéneas y pueden reflejar muchos sucesos patofisiológicos distintos. Véase Brockow K., *et al.*, *Allergy*: 57, 45 (2002). Se ha mostrado que algunos mecanismos inmunológicos implicados en estas reacciones están mediados ya sea por anticuerpos o por células. En la alergia a fármacos inmediata, una reacción de anticuerpo mediada por IgE se puede demostrar mediante un ensayo de pinchazo en la piel positivo y/o ensayo intradérmico después de 20 minutos, mientras que algunas reacciones no inmediatas a fármacos se pueden producir más de una hora después de la última ingesta de drogas y a menudo están mediadas por los linfocitos T. Algunas reacciones no inmediatas de tipo retardado mediadas por linfocitos T se pueden producir en pacientes con reacciones adversas a fármacos, por ejemplo a penicilinas. Se ha mostrado algunas respuestas de los linfocitos T proliferativos a las penicilinas se limitan a la subpoblación CLA+ (CD45RO+) de memoria de linfocitos T de pacientes alérgicos a la penicilina, mientras que el subconjunto CLA- de CD45RO+ no muestra ninguna respuesta proliferativa. Véase Blanca M., Leyva L., *et al.*, *Blood Cells Mol Dis*: 31, 75 (2003). Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) se pueden reproducir de forma artificial en ratones, lo que permite la evaluación de factores que pueden estar implicados en el inicio y perpetuación de la respuesta a DTH. El anticuerpo de neutralización de IL-31 podría ser eficaz en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Véase el Ejemplo 51.

La necrólisis epidérmica tóxica (TEN) es una reacción a fármacos muy rara pero extremadamente grave y caracterizada por apoptosis generalizada de la epidermis con ampollas importantes. Algunos estudios han mostrado que los linfocitos que infiltran la ampolla son linfocitos T CLA+ y pueden presentar citotoxicidad hacia los 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, mediante el cual OVA se expresa bajo el control del promotor de la queratina-5 (K5) en los queratinocitos foliculares epidérmicos y del pelo de los ratones, para establecer un modelo animal para la TEN. Los linfocitos T CD8+ específicos de OVA, cuando se transfieren de forma adoptiva en ratones K5-OVA, experimentan activación y proliferación en los nódulos linfáticos de drenaje de la piel y se dirigen a la piel de los ratones K5-OVA, lo que da como resultado el desarrollo de lesiones cutáneas que recuerdan a la TEN. Véase Azukizawa H., *et al.*, *Eur J Immunol*: 33, 1879 (2003).

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico de la TEN mediante inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Pénfigo bulloso

El pénfigo bulloso es un trastorno subepidérmico que se manifiesta en forma de ampollas subepidérmicas con un infiltrado dérmico de neutrófilos y eosinófilos. El diagnóstico se caracteriza por la presencia de anticuerpos específicos de antígeno frente a proteínas de adhesión específicas de la epidermis y de la unión dérmica-epidérmica. Véase Jordan R. E., *et al.*, *JAMA*: 200, 751 (1967). Algunos estudios que analizan el papel de los linfocitos T en la patogénesis del pénfigo bulloso por análisis de PBL y linfocitos T de ampollas cutáneas han encontrado un predominio de linfocitos T CLA+ que expresan aumento de los niveles de citoquinas Th2 tales como IL-4 e IL-13. Véase Teraki Y., *et al.*, *J Invest Dermatol*: 117, 1097 (2001). En algunos pacientes con pénfigo bulloso que siguen terapia con corticosteroides sistémicos, la frecuencia de células que producen interleuquina-13, de CLA+, pero no de CLA-, se reduce de forma significativa. La disminución de los células CLA+ después del tratamiento con corticosteroides se asocia con la mejora clínica. Véase Teraki, en el mismo lugar.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 con los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico del pénfigo bulloso mediante inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Alopecia areata

La alopecia areata (AA) se considera una enfermedad autoinmune limitada al tejido de los folículos pilosos en la que la actividad folicular se ha detenido debido a la actividad continuada de infiltrados linfocíticos. La AA da como resultado parches de pérdida de pelo en cualquier parte del cuerpo, aunque no se produce una pérdida real de los folículos pilosos, incluso en lesiones sin pelo. Aunque algunos signos clínicos de inflamación están ausentes, las biopsias de piel de los sitios de enfermedad activa muestran principalmente inflamación linfocítica perifolicular de las células CD4+, junto con un infiltrado intrafolicular de CD8+. Véase Kalish R.S. y Gilhar A. *J Invest Dermatol Symp Proc*: 8, 164 (2003).

Algunos estudios han mostrado que la piel del cuero cabelludo que infiltra linfocitos CD4+ o CD8+ expresa CLA y, en sangre periférica de individuos con AA, el porcentaje de linfocitos CD4+ o CD8+ de CLA+ es significativamente mayor que el de los controles normales. Además, algunos pacientes con AA grave o progresiva muestran una positividad hacia CLA- mucho más elevada en comparación con los pacientes que se recuperan de la enfermedad y una disminución en el porcentaje de células CLA+ se asemeja al un buen transcurso clínico. Véase Yano S., *et al.*, *Acta Derm Venereol*: 82, 82 (2002). Por lo tanto, estos estudios sugieren que los linfocitos CLA+ pueden

desempeñar un papel importante en la AA. Algunos modelos de xenoinjerto han mostrado que es probable que los linfocitos T activados desempeñen un papel en la patogénesis de la AA. El cuero cabelludo con lesiones de pacientes con AA injertados en ratones atímicos vuelve a hacer crecer el pelo de forma coincidente con una pérdida de linfocitos de infiltración del injerto y, la transferencia de linfocitos T activados lesionales a ratones SCID puede trasladar la pérdida del pelo a explantes de cuero cabelludo humano en ratones SCID. Véase Kalish R.S. y Gilhar A. J Investig Dermatol Symp Proc: 8, 164 (2003).

Diversas terapias de inmunomodulación forman parte del tratamiento habitual para este trastorno, sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha sido coherente en 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). Sin embargo, sus usos en modelos animales válidos proporcionan una herramienta para analizar de forma minuciosa algunos 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).

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico de la alopecia areata por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Acné Rosácea/Acné común

Se cree en algunas anomalías en la queratinización folicular producen la lesión de acné. El acné rosácea se diferencia del acné común por la presencia de pápulas rojas, pústulas, quistes y telangiectasias extensas, pero con ausencia de comedones (cabezas blancas). El aumento de la secreción de sebo de las glándulas sebáceas es un factor importante en la fisiopatología del acné común. Otras funciones de la glándula sebácea también están asociadas con el desarrollo de acné, incluyendo lípidos proinflamatorios sebáceos; diferentes citoquinas producidas localmente; péptidos y neuropéptidos periglandulares, tales como hormona de liberación de corticotrofina, que es producida por sebocitos; y la sustancia P, que se expresa en las terminaciones nerviosas en las proximidades de las glándulas de aspecto saludable de pacientes con acné. Véase Zouboulis C.C. Clin Dermatol: 22, 360 (2004).

Aunque la fisiopatología del acné común y el acné rosácea sigue siendo desconocida, algunas observaciones clínicas y estudios histopatológicos sugieren que la inflamación del folículo pilosebáceo puede ser fundamental para la patogénesis de la rosácea y el acné común. Algunos estudios iniciales sobre el análisis de subconjuntos de linfocitos T que infiltran legiones de rosácea indicaban que la mayoría de los linfocitos T expresaban CD4. Véase Ruffi T. y Buchner S.A. Dermatologica: 169, 1 (1984).

Los linfocitos T CD4+ producen IL-31 y el análisis de IHC de la piel para la expresión de IL-31 sugiere que IL-31 se expresa en glándulas sebáceas y sudoríparas. La estimulación de IL-31 de queratinocitos epidérmicos induce la expresión de quimioquinas que probablemente da como resultado la infiltración celular que sugiere que la 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, la IL-31 puede contribuir a la fisiopatología del acné rosácea y del acné común.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico del acné común por inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Prúrigo nodular

El prúrigo nodular es una erupción de nódulos liquenificados o excoriados causados por el prurito intratable que es difícil de tratar. Aunque el frotamiento crónico da como resultado liquenificación y arañazos en excoriaciones lineales, los individuos que rasgan y arañan cuando su piel irritada, que pica tienden a producir pápulas marcadamente engrosadas conocidas como nódulos de prúrigo. Aunque el prúrigo nodular no es específico de la dermatitis atópica, muchos pacientes con estos nódulos también tienen una reacción atópica, que se manifiesta como rinitis alérgica, asma o alergia alimentaria. Los linfocitos T representan la mayor parte de las células que se infiltran en las lesiones de prúrigo y estas lesiones a menudo representan la lesión de la piel más pruríticas en pacientes con atopía.

El tratamiento tópico del prúrigo nodular con capsaicina, un alcaloide antiprurítico que interfiere con la percepción de pruritos y dolor por agotamiento de neuropéptidos tales como la sustancia P en pequeños nervios cutáneos sensoriales, ha demostrado ser un régimen eficaz y seguro que da como resultado la eliminación de las lesiones cutáneas. Véase Stander S., *et al.*, J Am Acad Dermatol: 44, 471 (2001). Algunos estudios sobre la respuesta al picor en ratones NC/Nga usando tratamiento con capsaicina mostraron que el desarrollo espontáneo de lesiones de dermatitis se podía evitar casi totalmente. Además, el aumento de los niveles de IgE en suero se suprimía de forma significativa y se reducía la infiltración del número de eosinófilos y mastocitos en la piel con lesiones de los ratones tratados con capsaicina. Véase Mihara K., *et al.*, Br J Dermatol: 151, 335 (2004). Las observaciones de este grupo sugieren que el comportamiento de rascado podría contribuir al desarrollo de dermatitis mediante la mejora de

diversas respuestas inmunológicas, lo que implica, por lo tanto, que la prevención de la sensación de picor y/o el comportamiento rascado asociado con el picor podría ser un tratamiento eficaz para la AD. Véase Mihara K., *et al.*, Br J Dermatol: 151, 335 (2004). Por lo tanto, los anticuerpos anti-IL-31- que se describen en el presente documento serán útiles para minimizar los efectos de la AD, prurigo nodular, y otras enfermedades pruríticas, ya que en el presente documento se muestra que reducen la cantidad de rascado en ratones NC/Nga.

La administración crónica de IL-31 induce prurito y alopecia en ratones seguido por el desarrollo de lesiones cutáneas que se asemejan a las de la dermatitis, lo que sugiere que la IL-31 puede inducir picor. Véase Dillon S.R., *et al.*, Nat Immunol: 5, 752 (2004). La implicación de IL-31 se sometió a ensayo en la inducción de la respuesta al picor con dos métodos (i) tratamiento con capsaicina de ratones tratados con IL-31 y (ii) tratamiento con IL-31 de ratones con supresión genómica de Tac1, que presentan respuestas al dolor nociceptivo significativamente reducidas debido a la falta de expresión de neuropéptidos en el Ejemplo 52. Además, en el Ejemplo 12 se sometió a ensayo si la neutralización de IL-31 en ratones tratados con IL-31 podía prevenir el prurito y la alopecia.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 por los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico del prurigo nodular mediante inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Virus Trópicos para la Piel y Prurito Asociado con Virus

Los linfocitos T CD8+ específicos del Virus del Herpes Simple (VHS) en la sangre periférica y los linfocitos T CD8+ específicos del VHS recuperados de lesiones con herpes expresan niveles elevados de CLA mientras que los linfocitos T CD8+ específicos del virus del herpes no trópicos para la piel carecen de expresión de CLA. Véase Koelle D.M., *et al.*, J Clin Invest: 110, 537 (2002). Los linfocitos T CD4+ reactivos para VHS-2 también expresan CLA, pero a niveles más bajos que los observados anteriormente para los linfocitos T CD8+. Véase Gonzalez J.C., *et al.*, J Infect Dis: 191, 243 (2005). El prurito también se ha asociado con infecciones víricas de herpes (Véase Hung K.Y., *et al.*, Blood Purif. 16, 147 (1998)), aunque otras enfermedades víricas, tales como el VIH, también se han asociado con lesiones cutáneas pruríticas. El prurito intratable, grave, asociado a menudo con lesiones cutáneas eritematopapulares en hipereosinofilia, es una afección observada en algunos pacientes infectados con VIH no atópicos 36. Véase Singh F. y Rudikoff D, Am J Clin Dermatol; 4, 177 (2003); y Milazzo F., Piconi S., *et al.*, Allergy: 54, 266 (1999).

La asociación de los virus trópicos para la piel con prurito y linfocitos T CLA+ sugiere que la IL-31 que produce linfocitos T puede estar implicada en la fisiopatología de las infecciones víricas.

Por lo tanto, la neutralización de IL-31 con los anticuerpos que se describen en el presente documento se puede usar para mejorar el resultado clínico de prurito asociado de la piel con trópicos para la piel mediante inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o picor asociado con la enfermedad.

Además, la inflamación es una respuesta protectora de un organismo para defenderse de un agente invasor. La inflamación es un suceso en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de las respuestas inflamatorias pueden dejar inmunocomprometido a un hospedador; sin embargo, si no se controla, la inflamación puede conducir a complicaciones graves que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y similares), shock séptico y fallo multiorgánico. Es importante destacar que estos diversos estados patológicos comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto en la morbilidad y la mortalidad humana. Por lo tanto, es evidente que algunos anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-IL-31 y polipéptidos de unión que se describen en el presente documento, podrían tener un potencial terapéutico fundamental para un gran número de enfermedades en seres humanos y animales, de asma y alergia a autoinmunidad y shock séptico. Como tal, el uso de anticuerpos antiinflamatorios anti-IL-31 y polipéptidos de unión que se describen en el presente documento se pueden usar de forma terapéutica como antagonistas de IL-31 descritos en el presente documento, en particular en enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, enfermedades relacionadas y similares.

1. Artritis

La artritis, incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de lesión, y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían de del uso terapéutico de anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión tales como los anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención. 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 la artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que recubre la articulación, lo que causa dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, la membrana sinovial, puede invadir y dañar hueso y cartílago lo que conduce al deterioro de las articulaciones y dolor intenso entre otros efectos fisiológicos. La articulación afectada puede perder su forma y alineación, lo que da como resultado dolor y pérdida

de movimiento.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad mediata por el sistema inmune caracterizada en particular por inflamación y posterior daño tisular que conducía discapacidad grave y aumento de la mortalidad. En las articulaciones reumatoideas se produce diversas citoquinas de forma local. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y TNF-alfa, dos citoquinas proinflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de las articulaciones. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa e IL-1 en pacientes con RA ha conducido a una mejora radical de los signos clínicos y biológicos de inflamación y una reducción de los signos radiológicos de erosión ósea y destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que otros mediadores también están implicados en la fisiopatología de la artritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2 (2): 135-149, 2002). Uno de esos mediadores podría ser IL-31, y como tal, una molécula que se une o inhibe IL-31, tal como anticuerpos anti IL-31 o compañeros de unión, podría servir como agente terapéutico valioso para reducir la inflamación en la artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas.

Existen varios modelos animales de artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se parece en gran medida a la artritis reumatoide humana. Dado que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la RA, esto la convierte en un modelo ideal para identificación sistemática de compuestos antiinflamatorios humanos potenciales. El modelo de CIA es un modelo bien conocido en ratones que depende, para que se produzca, tanto de una respuesta inmune como de una respuesta inflamatoria. La respuesta inmune comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ como respuesta al colágeno, que se proporciona como un antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas tisulares de mediadores de inflamación, como consecuencia de algunas de estas reacciones cruzadas de anticuerpos con el colágeno nativo del ratón y que activa la cascada de complementos. Una ventaja del uso del modelo de CIA es que se conocen los mecanismos básicos de la patogénesis. Se han identificado los epítomos relevantes de los linfocitos T y de los linfocitos B en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpos anti-colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citoquinas, quimioquinas, y enzimas que degradan la matriz) que se relacionan con la artritis mediada con el sistema inmune, y por lo tanto se pueden usar para evaluar la eficacia del compuesto de ensayo en el modelo de CIA (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3: 407-20, 1999; Williams *et al.*, *Immunol.* 89: 9784-788, 1992; Myers *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 (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos que se describen en el presente documento), tales como IL-31RA-Fc4 u otra IL-31RA soluble y proteínas de fusión a estos ratones de modelo de CIA se usó para evaluar el uso de IL-31RA para mejorar los síntomas y para alterar el transcurso de la enfermedad. Como una molécula que modula la respuesta inmune e inflamatoria, IL-31, puede inducir la producción de SAA, que está implicada en la patogénesis de la artritis reumatoide, algunos antagonistas de IL-31 pueden reducir la actividad de SAA *in vitro* e *in vivo*, la administración sistémica o local de antagonistas de IL-31 tales como anticuerpos anti-IL-31 o compañeros de unión, IL-31RA que comprende polipéptidos (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos que se describen en el presente documento), tales como IL-31RA-Fc4 u otra IL-31RA soluble y proteínas de fusión pueden suprimir potencialmente la respuesta inflamatoria en RA. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de IL-31RA, polipéptidos de receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti IL-31 de la presente invención, y similares.

2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que normalmente es el resultado de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedad infecciosos, sepsis, síndrome del shock tóxico, o en pacientes inmunocomprometidos sometidos a infecciones oportunistas, y similares. Algunos anticuerpos terapéuticamente útiles de anticuerpos antiinflamatorios y polipéptidos de unión, tales como anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención, podrían ayudar en la prevención y el tratamiento de la endotoxemia en seres humanos y animales. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de IL-31RA, polipéptidos de receptor heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti IL-31 de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacáridos (LPS) involucra a muchos de los mediadores proinflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y la endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo ampliamente usado y aceptable el estudio de los efectos farmacológicos de agentes proinflamatorios o de inmunomodulación potenciales. La LPS, producida en bacterias gram-negativas, es un agente causal principal en la patogénesis del shock séptico (Glausner *et al.* *Lancet* 338: 732, 1991). De hecho, un estado similar al del shock se puede inducir de forma experimental con una sola inyección de LPS en animales. Algunas moléculas producidas por células que responden a LPS pueden dirigir los patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al hospedador frente a patógenos invasivos, también pueden causar daño. Por lo tanto, la estimulación masiva de la inmunidad innata, que como resultado de infección grave por bacterias Gram-negativas, conduce un exceso de producción de citoquinas y otras moléculas, y al desarrollo de un síndrome mortal, el

síndrome del shock séptico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, y fallo orgánico múltiple (Dumitru *et al.*, Cell 103: 1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos de la LPS se relacionan principalmente con la activación de macrófagos lo que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, parece que TNF desempeña un papel fundamental, tal como lo indica la prevención de la toxicidad de LPS mediante la administración de anticuerpos anti-TNF de neutralización (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). Está bien establecido que una inyección de 1 ug de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 dará como resultado aumentos significativos de IL-6 en circulación, TNF-alfa, IL-1, y proteínas de fase aguda (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. Parece que la toxicidad de LPS está mediada por estas citoquinas ya que la inmunización pasiva frente a estos mediadores puede dar como resultado una disminución de la mortalidad (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). Las estrategias de inmunointervención potencial para la prevención y/o tratamiento del shock séptico incluyen mAb anti-TNF, antagonista del receptor IL-1, LIF, IL-10, y G-CSF. Dado que LPS induce la producción de factores proinflamatorios que posiblemente contribuyen a la patología de la endotoxemia, la neutralización de la actividad de IL-31, SAA otros factores proinflamatorios mediante la antagonista acción del polipéptido IL-31 se puede usar para reducir los síntomas de endotoxemia, tal como se observa en el shock endotóxico. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de IL-31RA, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico solubles, o anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención, y similares.

20 3. Enfermedad Intestinal Inflamatoria. IBD

En Estados Unidos, aproximadamente 500.000 padecen Enfermedad Intestinal Inflamatoria (IBD) que puede afectar al colon y al recto (Colitis Ulcerosa) o tanto al intestino delgado como al grueso (Enfermedad de Crohn). La patogénesis de estas enfermedades no es clara, pero implican inflamación crónica de los tejidos afectados. Algunos agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de IL-31 RA, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico solubles, o anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención, y similares, podrían servir como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en IBD y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (UC) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, normalmente denominado colon, caracteriza por inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento más interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, dando como resultado diarrea. Algunos síntomas incluyen el ablandamiento de las heces y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la UC se desconoce, la investigación reciente sugiere que las defensas naturales del organismo están funcionando frente a proteínas en el organismo que el organismo cree que son extrañas (una "reacción autoinmune"). Quizá debido a que se parecen a las proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden o bien iniciar o estimular del proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. Dado que el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad normalmente comienza en la zona rectal y en ocasiones se puede extender a través de todo el intestino grueso. Los episodios repetidos de inflamación conducen al engrosamiento de la pared del intestino y del recto con tejido cicatricial. Con la enfermedad grave se puede producir muerte del tejido del colon o sepsis. Los síntomas de la colitis ulcerosa varían en su gravedad y su inicio puede ser gradual o repentino. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores, que incluyen infecciones respiratorias o estrés.

aunque en la actualidad no existe cura disponible para la UC, algunos tratamientos se centran en la supresión del proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Algunos tratamientos que incluyen agentes inmunosupresores de corticosteroides (por ejemplo, Azatioprina, mercaptopurina, y metotrexato) y aminosalicilatos están disponibles para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso a largo plazo de agentes inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede dar como resultado graves efectos secundarios que incluyen debilitamiento de los huesos, cataratas, infección, y efectos en el hígado y en la médula ósea. En los pacientes en cuyas terapias actuales no son satisfactorias, la cirugía es una opción. La cirugía implica la eliminación de todo el colon y el recto.

Hay varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más ampliamente usado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando el TNBS se introduce en el colon de ratones susceptibles a través de instilación intra-rectal, éste induce respuesta inmune mediada por linfocitos T en la mucosa del colon, en este caso conduciendo a una inflamación masiva de la mucosa caracterizada por la infiltración densa de linfocitos T y macrófagos a través de toda la pared del intestino grueso. Además, esta representación histopatológica va acompañada por la representación clínica de pérdida de peso progresiva (debilitante), diarrea sanguinolenta, prolapso rectal, y adelgazamiento de la pared del intestino grueso (Neurath *et al.*, Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000).

Otro modelo de colitis usa sulfato del dextrano sódico (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño de la cripta focal, y ulceración epitelial. Se cree que estos cambios se desarrollan

debido a un efecto tóxico de DSS en el epitelio y por fagocitosis de células de la lámina propia cells y producción de TNF-alfa y IFN-gamma. A pesar de este uso común, varios asuntos con respecto a los mecanismos de DSS con respecto a la importancia de la enfermedad humana siguen sin resolver. El DSS se contempla como un modelo independiente de linfocitos T porque se observa en animales con déficit de linfocitos T tales como los ratones SCID.

5 La administración de anticuerpos anti-IL-31 o compañeros de unión, polipéptidos que comprenden IL-31RA soluble (incluyendo receptores heterodiméricos y multiméricos), tales como IL-31RA-Fc4 u otro IL-31RA soluble y proteínas de fusión a estos modelos de TNBS o DSS se puede usar para evaluar el uso de antagonistas de IL-31 para mejorar los síntomas y para alterar el transcurso de la enfermedad gastrointestinal. IL-31 puede desempeñar un papel en la
10 respuesta inflamatoria en la colitis, y la neutralización de la actividad de IL-31 mediante la administración de antagonistas de IL-31 es un enfoque terapéutico potencial para la IBD. Otros agentes terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de IL-31RA, polipéptidos de receptor heterodimérico y multimérico solubles, o anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención, y similares.

15 4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis se produce cuando las nuevas células cutáneas crecen de forma anómala, dando como resultado parches de la piel inflamados, hinchados, y descamados cuando la piel vieja no se ha eliminado lo suficientemente rápido. La psoriasis
20 en placas, la forma más común, se caracteriza por parches de piel inflamados ("lesiones") es el que presentan en su parte alta escamas de color blanco plateado. La psoriasis se puede limitar a unas pocas placas o puede implicar zonas de piel moderadas a extensas, que aparecen lo más habitualmente en el cuero cabelludo, rodillas, codos y tronco. Aunque es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de la enfermedad sin implicar inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de IL-31RA, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención, y similares, podrían servir
25 como un agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias de la piel y la mucosa y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio de la piel mediado por linfocitos T que puede provocar una incomodidad considerable. Es una enfermedad para la que no existe cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente un dos por ciento de las poblaciones de Europa y América del Norte. Aunque los individuos con psoriasis leve a menudo pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo necesita terapia de inmunosupresión con luz ultravioleta o sistémica. Desafortunadamente, los inconvenientes y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidad desde muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente tienen recaída de la psoriasis, y en algunos casos r

IL-31 se aisló de tejido conocido por tener una función inmunológica importante y que contenía células que desempeñan un papel en el sistema inmune. IL-31 se expresa en células de sangre periférica activadas, CD3+ seleccionadas, y se ha mostrado que la expresión de IL-31 aumenta después de la activación de los linfocitos T. Además, los resultados de experimentos que se describen en la sección de Ejemplos en el presente documento sugieren que los polipéptidos que se describen en el presente documento pueden tener un efecto en el crecimiento/expansión de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y/o estado diferenciado de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK o precursores de estas células. Por lo general se conocen algunos factores que estimulan tanto la proliferación de precursores hematopoyéticos como de células maduras, sin embargo, la proliferación y la activación también pueden requerir factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que IL-7 y el Factor de Steel (ligando c-kit) eran necesarios para la formación de colonias de precursores de linfocitos NK. IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y el Factor de Steel era más eficaz (Mrózek *et al.*, Blood 87: 2632-2640, 1996). Sin embargo, algunas citoquinas sin identificar pueden ser necesarias para la proliferación de subconjuntos específicos de linfocitos NK y/o precursores de linfocitos NK (Robertson *et al.*, Blood 76: 2451-2438, 1990). De forma análoga, IL-31 puede actuar solo o en como un o sinergia con otras citoquinas para aumentar el crecimiento, proliferación, expansión y modificación de la diferenciación de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B o linfocitos NK.

55 La presente memoria descriptiva describe la inhibición de la activación o diferenciación de monocitos/macrófagos. Los monocitos son células diferenciadas de forma incompleta que se desplazan a diversos tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune mediante la presentación del antígeno a linfocitos y desempeñan un papel de soporte como células auxiliares para linfocitos mediante la secreción de numerosas citoquinas. Los macrófagos pueden internalizar moléculas extracelulares y después de la activación tienen un aumento de la capacidad para eliminar microorganismos intracelulares y células tumorales. Algunos macrófagos activados también están implicados en la estimulación de la inflamación aguda o local.

65 La distribución de de receptores en el tejido para una citoquina dada ofrece una gran indicación de los sitios potenciales de acción de esa citoquina. La expresión de IL-31RA se observan monocitos y linfocitos B, con un aumento radical de la expresión después de la activación de linfocitos T CD3+, 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 eran positivas para la expresión de IL-31RA.

5 También se informa que la expresión de OSMR es muy amplia (Mosley *et al.*, JBC 271: 32635-32643, 1996). Esta distribución de receptores de IL-31RA y OSM apoya un papel para IL-31 en las respuestas inmunes, especialmente la expansión de los linfocitos T después de su activación o un papel en el brazo de monocitos/macrófagos del sistema inmune.

10 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe el uso de heterodímeros de IL-31RA/OSMR solubles como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, Enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), Enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmune, sepsis, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto frente a hospedador; y en el que la inhibición de la inflamación, supresión inmune, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunes, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmune a un patógeno o antígeno. Además, la presencia de expresión de IL-31RA en células inmunes activadas tales como células CD4+ y CD19+ activadas mostraba que el receptor IL-31RA puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunes del organismo frente a invasores extraños: tales como microorganismos y residuos celulares, y podría desempeñar un papel en las respuestas inmunes durante la inflamación y formación de cáncer. Como tal, los anticuerpos anti-IL-31 de la presente invención son antagonistas de la función del receptor de IL-31RA, y se pueden usar para modificar la respuesta inmune y la inflamación.

25 La IL-31 puede encontrar utilidad en la supresión del sistema inmune, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, que incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, etc. La supresión inmune también se puede usar para reducir el rechazo de trasplantes e injertos de tejido u órganos y para tratar leucemias o linfomas específicos de linfocitos T, linfocitos B o monocitos, y otros cánceres, mediante la inhibición de la proliferación del tipo de célula afectada. Además, IL-31 se puede usar para detectar monocitos, macrófagos, y linfocitos T activados y para ayudar en el diagnóstico de tal enfermedad autoinmune, en particular patologías en las que los monocitos están elevados o activados.

30 Algunos polipéptidos de IL-31, péptidos, anticuerpos y similares también se pueden usar dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de los niveles en circulación de IL-31. Dentro de una realización relacionada, se pueden usar anticuerpos u otros agentes que se unen de forma específica a polipéptidos de IL-31 para detectar los polipéptidos de IL-31 en circulación. Los niveles elevados o disminuidos de polipéptidos de ligando pueden ser indicativos de afecciones patológicas, que incluyen cáncer. Algunos polipéptidos de IL-31 pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente.

40 Además, un experto en la materia reconocería aquí algunos antagonistas de IL-31 son útiles. Por ejemplo, en lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos en células endoteliales. Estas lesiones se podrían prevenir con el uso de antagonistas para IL-31. Como antagonistas para la IL-31 también se pueden usar algunos anticuerpos anti-IL-31 (por ejemplo, anticuerpo de neutralización de IL-31), receptores solubles de IL-31RA, heterodímeros y multímeros, y compañeros de unión a IL-31. Además, la leucemia monoclonal está asociada con diversas anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos del macrófagos, que algunos ejemplos incluyen niveles elevados de lisozimas en el suero y en la orina y fiebres elevadas. Además, tales leucemias presentan un aumento anómalo de células monocíticas. Estos efectos se podrían evitar posiblemente con antagonistas para IL-31, tal como se describe en el presente documento. Además, anti-IL-31 se puede conjugar con moléculas tales como restos tóxicos y citoquinas, como se describe en el presente documento para dirigir la eliminación de células monocíticas de leucemia.

50 Dado que IL-31 se expresa de una manera específica de linfocitos T, macrófagos y monocitos, y estas enfermedades implican anomalías de las células monocíticas, tales como proliferación, unción, localización, y activación celular, los polinucleótidos y polipéptidos que se desvelan en el presente documento, y anticuerpos de la presente invención se pueden usar como agentes de diagnóstico para detectar tales anomalías de células monocíticas, e indican la presencia de enfermedad. Tales métodos implican la toma de una muestra biológica de un paciente, tal como sangre, saliva, o biopsia, y compararla con una muestra de control normal. Métodos histológicos, citológicos, citometría de flujo, bioquímicos y otros métodos se pueden usar para determinar los niveles relativos a 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 la expresión de IL-31, o un cambio en el número o localización de monocitos (por ejemplo, aumento o infiltración de células no críticas en tejidos cuando no están normalmente presentes) en comparación con un control sería indicativo de enfermedad. Tales métodos de diagnóstico también pueden incluir el uso de etiquetas radiométricas, fluorescentes y colorimétricas unidas a polinucleótidos o polipéptidos que se desvelan en el presente documento, o anticuerpos de la presente invención. Tales métodos conocen bien en la técnica y se desvelan en el presente documento.

65

Se ha mostrado que IL-31 se expresa en células mononucleares activadas, y puede estar implicada en la regulación de la inflamación. Como tal, los polipéptidos de la presente divulgación se pueden someter al ensayo usar por su capacidad para modificar la información, o se pueden usar como un marcador de inflamación. En la técnica se conocen algunos métodos para determinar cualidades proinflamatorias y antiinflamatorias de IL-31 y se analizan en el presente documento. Además, puede estar implicada en la regulación positiva de la producción de reactivos de fase aguda, tales como amiloide A de suero (SAA), α 1-antiquimotripsina, y haptoglobina, y esa expresión de ligando del receptor IL-31RA se puede aumentar después de la inyección de lipopolisacáridos (LPS) *in vivo* que están implicados en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000). La producción de proteínas de fase aguda, tales como SAA, se considera un mecanismo de supervivencia a corto plazo cuando la inflamación es beneficiosa; sin embargo, el mantenimiento de proteínas de fase aguda durante periodos de tiempo más largos contribuye a la inflamación crónica y puede ser nocivo para la salud humana. hará una revisión, véase Uhlar, CM y Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999, y Baumann H. y Gaudie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994. Además, la proteína de fase aguda, SAA, está implicada en la patogénesis de varias enfermedades crónicas inflamatorias, está implicada en la aterosclerosis y en la artritis reumatoide, y es la precursora de la proteína de amiloide A depositada en la amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, mencionado anteriormente). Por lo tanto, cuando un ligando tal como IL-31 que actúa como una molécula proinflamatoria e induce la producción de SAA, algunos antagonistas serían útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria y otras enfermedades asociadas con proteínas de respuesta de fase aguda inducidas por el ligando. Tales antagonistas se proporcionan en la presente invención, como se definen las reivindicaciones. Un método para reducir la inflamación puede comprender la administración a un mamífero con inflamación de una cantidad de una composición de IL-31, o anticuerpo anti-IL-31 (por ejemplo, anticuerpo de neutralización) que es suficiente para reducir la inflamación. Además, un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína de amiloide A en suero; (2) administrar una composición que comprende un polipéptido de IL-31 o un anticuerpo anti-IL-31 como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel de proteína de amiloide A en suero después de la administración; (4) comparar el nivel de la proteína de amiloide A en suero en la etapa (1) con el nivel de proteína de amiloide A en suero en la etapa (3), en la que una falta de aumento o una disminución del nivel de la proteína de amiloide A en suero es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

Al igual que IL-31, el análisis de la distribución tisular del ARNm que corresponde a su ADNc receptor de IL-31RA mostraba que el nivel de ARNm era el más elevado en monocitos células de la próstata, y es elevado en monocitos activados, y en células CD4+ activadas, células CD8+ activadas, células CD3+ activadas. Por lo tanto, el receptor de IL-31RA también está implicado en la inducción de respuesta inflamatoria e inmune. Por lo tanto, algunas realizaciones de la presente invención en particular se dirigen hacia el uso de anticuerpos IL-31, como se define en las reivindicaciones como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes tales como, pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, Enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), Enfermedad de Crohn, cáncer de colon e intestinal, diverticulosis, enfermedad autoinmune, sepsis, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto frente a hospedador; y en las que la inhibición de la inflamación, supresión inmune, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunes, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluyendo células Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), supresión de la respuesta inmune a un patógeno o antígeno. Además, la presencia del receptor de IL-31RA y la expresión de IL-31 en células inmunes a que las tales como monocitos CD3+ activados, células CD4+ y CD19+ mostraba que el receptor de IL-31RA puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunes del organismo frente de invasores extraños: tales como microorganismos y restos celulares, y podría desempeñar un papel en respuestas inmunes durante la inflamación y formación de cáncer. Como tal, IL-31 y anticuerpos IL-31 de la presente invención que son agonistas o antagonistas de la función del receptor IL-31 RA, se pueden usar para modificar la respuesta inmune y la inflamación.

Algunos polipéptidos de IL-31 que se unen a polipéptidos del receptor IL-31RA, y anticuerpos para los mismos son útiles para:

1) Antagonizar o bloquear la señalización a través de receptores que comprenden IL-31RA en el tratamiento de inflamación aguda, inflamación como resultado de traumatismo, lesión tisular, cirugía, sepsis o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad inflamatoria del intestino (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 asociadas con la inducción de respuesta de fase aguda.

2) Antagonizar o bloquear la señalización a través de receptores del receptor de IL-31RA en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como IDDM, esclerosis múltiple (MS), lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia gravis, artritis reumatoide, e IBD para prevenir o inhibir la señalización en células inmunes (por ejemplo, linfocitos, monocitos, leucocitos) a través del receptor de IL-31RA (Hughes C *et al.*, J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Como alternativa, algunos anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales (MAb) para IL-31, también se pueden usar un antagonista para suprimir células inmunes no deseadas para tratar enfermedades autoinmunes. Asma, alergia y otras enfermedades atópicas se pueden tratar con un MAb frente a, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-31, receptores solubles del receptor IL-31RA soluble o heterodímeros de IL-31RA/CRF2-4, para inhibir la respuesta

5 inmune para suprimir células de ataque. El bloqueo o la inhibición de la señalización a través de IL-31RA, usando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, también puede beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, pituitaria y células neuronales. IDDM, NIDDM, pancreatitis, y carcinoma pancreático se pueden beneficiar. IL-31RA puede servir como una diana para terapia del cáncer con MAb en el que un MAb antagonista inhibe el crecimiento
 10 del cáncer y dirige la muerte mediada por el sistema inmune. (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Algunos Mab para monómeros del receptor de IL-31RA soluble, homodímeros, heterodímeros y multímeros también pueden ser útiles para tratar nefropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades proliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con SLE, IDDM, diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

15 3) Agonizar o iniciar la señalización a través de los receptores de IL-31RA en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como IDDM, MS, SLE, miastenia gravis, artritis reumatoide, e IBD. IL-31 puede señalar linfocitos otras células inmunes para diferenciar, alterar la proliferación, o cambiar la producción de citoquinas o proteínas de superficie celular que mejoran la autoinmunidad. De forma específica, la modulación de una respuesta de linfocitos T auxiliares con respecto a un patrón alternativo de secreción de citoquina puede desviar una respuesta autoinmune para mejorar la enfermedad (Smith JA *et al.*, J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998). De forma análoga, IL-31 se puede usar para señalar, suprimir y desviar las células inmunes implicadas en asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización a través del receptor de IL-31RA también puede beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón,
 20 pituitaria y células neuronales. IDDM, NIDDM, pancreatitis, y carcinoma pancreático se pueden beneficiar. IL-31RA puede servir como una diana para terapia del cáncer pancreático con MAb en el que un MAb de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y dirige la muerte mediada por el sistema inmune (Tutt, AL *et al.*, J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). De forma análoga 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, anti cuerpo de neutralización) para receptores solubles que comprenden IL-31RA desvelados en el presente documento.

25 Algunos anticuerpos anti-IL-31, polipéptidos monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos del receptor de IL-31RA soluble que se describen en el presente documento se pueden usar para neutralizar/bloquear la actividad del ligando receptor de IL-31RA en el tratamiento de enfermedad autoinmune, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal como se ha descrito anteriormente.

30 Algunos anticuerpos anti-IL-31, y receptores que comprenden IL-31RA soluble son útiles como antagonistas de IL-31. Tales efectos antagonistas se pueden conseguir mediante neutralización directa o unión de su ligando natural. Además de muchos antagonistas, los receptores solubles se pueden unir a IL-31 y pueden actuar como vehículo o proteínas vehículo, con el fin de transportar IL-31 a diferentes tejidos, órganos, y células dentro del organismo. Como tal, los receptores solubles se pueden fusionar o acoplar con moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo de receptor soluble-ligando a un sitio específico, tal como un tejido, célula inmune específica, monocitos, o tumor. Por ejemplo, en infección aguda o algunos cánceres, el beneficio puede resultar de la inducción de inflamación y proteínas de respuesta de fase aguda locales. Por lo tanto, los receptores solubles que se describen
 35 presente documento o anticuerpos de la presente invención se pueden usar para dirigir de forma específica a la acción de un ligando de IL-31 proinflamatorio. Véase, Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000.

40 Generalmente, la dosificación del polipéptido administrado IL-31 (o análogo de IL-31RA o proteína de fusión) variada dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, condición médica en general e historia médica previa del paciente. Por lo general, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de polipéptido de IL-31 que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también se puede administrar una dosificación menor o mayor según lo determinen las circunstancias. Un experto en la materia puede determinar fácilmente tales dosificaciones, y ajustes a las mismas, usando métodos conocidos en la técnica.

45 La administración de un polipéptido de IL-31 a un sujeto puede ser tópica, por inhalación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional, o mediante inyección intralesional. Cuando las proteínas terapéuticas se administran mediante inyección, la administración se puede realizar mediante infusión continua o con bolos individuales o múltiples.

50 Algunas vías de administración adicionales incluyen oral, mucosal-membrana, pulmonar, y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas de proteinoides, microesferas de policianoacrilato, y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal se ejemplifica con un modo tal como la administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe e Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1999)). Se pueden preparar partículas secas o líquidas que comprenden IL-31 y se inhalan con la ayuda de dispersadores de polvo seco, dispersadores de aerosol líquido, o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, TIBTECH 16: 343 (1998); Patton *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999)). Este enfoque se ilustra con el sistema de gestión de la diabetes AERX, que es un inhalador electrónico de mano que administra insulina aerosolizada en los pulmones.

Algunos estudios han mostrado que algunas proteínas con un tamaño tan grande como de 48.000 kDa se han administrado a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri *et al.*, Science 269: 850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión a IL-31 (Potts *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10: 213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende una proteína, polipéptido, o péptido que tiene actividad de unión a IL-31 se puede formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración la puede tolerar un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia conocen otros vehículos adecuados. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995).

Para fines de terapia, algunas moléculas que tienen actividad de unión a IL-31 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una proteína, polipéptido, o péptido que tiene actividad de unión a IL-31 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia al menos una parte de la respuesta inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende IL-31 (o análogo de IL-31 o proteína de fusión) se puede proporcionar en forma líquida, en un aerosol, o en forma sólida. Algunas formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotitas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Algunas formas sólidas a modo de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos, y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes

(Bremer *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10: 239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps", en 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", en 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.

Los anticuerpos anti-IL-31 que se desvelan en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan con métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y los documentos de Pat. de Estados Unidos N^{os} 4.485.045 y 4.544.545. Algunos liposomas con aumento del tiempo de circulación se desvelan en el documento de Pat. de Estados Unidos N^o 5.013.556.

Algunos liposomas particularmente útiles se pueden generar con el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Algunos fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Algunas formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para almacenamiento por mezcla del anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Algunos vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos) polipéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes de quelación tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween.TM., Pluronic.TM. o polietilenglicol (PEG).

En el presente documento, la formulación también puede contener más de un compuesto activo, si fuera necesario, para la indicación que se está tratando en particular, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no influyen entre sí de forma adversa. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente anticuerpos que se unen a IL-31 en una formulación. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente quimioterapéutico o una citoquina. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración del fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar a la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Algunos estudios adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento de Pat. de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ . etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el Lupron Depot.TM. (microesferas inyectables formadas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitúterico. Aunque algunos 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 durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, éstos se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de restos de sulfhidrilo, liofilización de soluciones ácidas, control del contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matriz de polímero.

Algunos liposomas proporcionan un medio para administrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, podría intratecal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, o mediante administración oral, inhalación, o administración intranasal. Algunos liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase, por lo general, Bakker-Woudenberg *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, Drugs 46: 618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Algunos liposomas tienen una composición similar a la de las membranas celulares y como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . Diversos agentes se pueden encarcelar en liposomas: reparto de agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de agentes hidrófilos dentro del espacio o espacios a usos internos (véase, por ejemplo, Machy *et al.*, Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987), y Ostro *et al.*, American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, composición del lípido, así como las características de carga y superficie de los liposomas.

Algunos liposomas pueden adsorber prácticamente cualquier tipo de célula y a continuación liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido se puede endocitosar por células que son fagocíticas. La endocitosis va seguida de degradación intralisosomal de lípidos liposomales y liberación de los agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985)). Después de administración intravenosa, por lo general pequeños liposomas (de 0,1 μm a 1,0 μm) son aceptados por las células del sistema reticuloendotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que algunos liposomas con un tamaño mayor que 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta absorción preferente de liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial se puede eludir con varios métodos que incluyen saturación con grandes dosis de partículas de liposoma, o inactivación selectiva de macrófagos con medios farmacológicos (Claassen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glicolípido o polietilenglicol en membranas de liposomas da como resultado absorción significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, Biochim. Biophys.

Acta 1150: 9 (1993)).

Algunos liposomas también se pueden preparar para dirigirse a células u órganos en particular mediante la variación de la composición del fosfolípido o mediante la inserción de receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, se han usado algunos liposomas, preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico, para dirigirse al hígado (Hayakawa *et al.*, documento de patente japonesa N° 04-244,018; Kato *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol, y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío, y a continuación reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha mostrado que una formulación liposomal de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de glucósido de esterilo (SG) derivado de soja y colesterol (Ch) se dirige al hígado (Shimizu *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).

Como alternativa, diversos ligandos de dirección se pueden unir a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas, y proteínas de transporte. Por ejemplo, algunos liposomas se pueden modificar con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan de forma exclusiva en la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). De forma análoga, Wu *et al.*, Hepatology 27: 772 (1998), han mostrado que el etiquetado de liposomas con asialofetúina conduce a una disminución de la vida media en plasma del liposoma y en mayor medida aumenta la absorción de liposoma etiquetado con asialofetúina por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación de liposomas en el hígado que comprende derivados de galactosilípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante inyección previa de asialofetúina (Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Algunos liposomas de albúmina de suero humano poliaconitilada proporcionan otro enfoque para la dirección de liposomas a células hepáticas (Kamps *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997)). Además, Geho, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.603.044, describen un sistema de administración de vesícula liposoma dirigida a hepatocitos, que tiene especificidad hacia receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

Los polipéptidos que tienen una actividad de unión a IL-31 se pueden encapsular dentro de liposomas usando 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", en Liposome Technology, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, algunos liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, algunos liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

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

Los expertos en la materia pueden concebir otras formas de dosificación, como se muestra, por ejemplo, en Ansel y Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5ª Edición (Lea y Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).

Como una ilustración, algunas composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de un kit que contiene un envase que comprende un polipéptido de IL-31 o un antagonista de IL-31 (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de IL-31). Los polipéptidos terapéuticos se pueden proporcionar en forma de una solución inyectable para una sola dosis o múltiples dosis, o en forma de un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, tal kit puede incluir un dispersado de polvo seco, generador de aerosol líquido, o nebulizador para administración de un polipéptido terapéutico.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC; b) Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC; c) Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC; d) Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC; e) Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC; f) Denominación PTA-6871 del Depósito de

Patentes de la ATCC; g) Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC; h) Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC; y i) Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC. Dentro de una realización, el anticuerpo neutraliza la interacción de IL-31 (SEC ID N°: 2) con IL-31RA (SEC ID N°: 5). Dentro de otra realización, el anticuerpo es (a) un anticuerpo monoclonal murino, (b) un anticuerpo humanizado derivado de (a), o (c) un fragmento de anticuerpo, o (d) un anticuerpo monoclonal humano. Dentro de otra realización, el anticuerpo comprende adicionalmente un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, etiqueta peptídica, partícula magnética, o toxina. Dentro de otra realización, el anticuerpo comprende adicionalmente PEGilación. Dentro de otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización. Dentro de otra realización, la administración del anticuerpo a un mamífero inhibe, previene, reduce o bloquea la actividad proinflamatoria del polipéptido. Dentro de otra realización, la administración del anticuerpo a un mamífero inhibe, previene, reduce o bloquea el picor y la dermatitis asociados con la actividad proinflamatoria del polipéptido.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC; b) Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC; c) Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC; d) Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC; y e) Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC; b) Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC; y c) Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC; y b) Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC; y b) Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación PTA-6874 del Depósito de Patentes de la ATCC. Dentro de una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización. Dentro de una realización, la administración del anticuerpo a un mamífero inhibe, previene, reduce o bloquea la actividad proinflamatoria del polipéptido. Dentro de una realización, la administración del anticuerpo a un mamífero inhibe, previene, reduce o bloquea el picor y la dermatitis asociados con la actividad proinflamatoria del polipéptido.

La memoria descriptiva describe la reducción de la inflamación en un mamífero que comprende la administración al mamífero de una cantidad de los anticuerpos IL-31 que se describen en el presente documento, mediante lo cual la inflamación se reduce.

La memoria descriptiva describe el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria en la que la IL-31 desempeña un papel, que comprende: administración de un antagonista de IL-31 al mamífero de modo que la inflamación se reduce, en el que el antagonista comprende (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o polipéptido de unión que se une de forma específica a un polipéptido o fragmento de polipéptido de IL-31RA o (ii) un polipéptido o fragmento de polipéptido de IL-31RA; y en el que la actividad inflamatoria de IL-31 se reduce. Dentro de una realización, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria que comprende enfermedades pruríticas. Dentro de una realización, la enfermedad es dermatitis atópica. Dentro de una realización, la enfermedad es prurito nodular.

La memoria descriptiva describe la reducción, inhibición o prevención del efecto del prurito en un mamífero en el que IL-31 desempeña un papel, que comprende: administración de un antagonista de IL-31 al mamífero de modo que el prurito se reduce, en el que el antagonista comprende (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o polipéptido de unión que se une de forma específica a un polipéptido o fragmento de polipéptido del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o un fragmento del mismo; y en el que la actividad prurítica de IL-31

se reduce. Dentro de una realización, la enfermedad del mamífero es dermatitis atópica. Dentro de una realización, la enfermedad del mamífero es dermatitis. Dentro de una realización, el anticuerpo es un anticuerpo como se describe en el presente documento.

5 La memoria descriptiva describe la reducción, inhibición o prevención del efecto del prurito en un mamífero en el que IL-31 desempeña un papel, que comprende: administración de un antagonista de IL-31 al mamífero de modo que se produce una reducción del picor en el mamífero en el que el antagonista comprende (i) un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o polipéptido de unión que se une de forma específica a un polipéptido o fragmento de polipéptido del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, o un fragmento del mismo; y mediante
10 el cual la actividad de picor de IL-31 se reduce. Dentro de una realización, la enfermedad del mamífero es dermatitis atópica. Dentro de una realización, la enfermedad del mamífero es dermatitis. Dentro de una realización, el anticuerpo es un anticuerpo como se describe en el presente documento.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en el que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el número de denominación del clon del hibridoma seleccionado entre: a) clon 292.12.3.1 (Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC); b) clon 292.63.5.3 (Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC); c) clon 292.72.3.1 (Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC); d) clon 292.84.1.6 (Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC); y e) clon
20 292.118.6.4 (Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC).

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en el que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el número de denominación del clon del hibridoma seleccionado entre: a) clon 294.35.2.6.3 (Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC); b) clon 294.144.3.5 (Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC); c) clon 294.154.5.6 Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC); y d) clon 294.163.2.1 (Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC).
25

La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que es capaz de competir por la unión a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 en la que el polipéptido es capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC; b) Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC; c) Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC; d) Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC; e) Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC; f) Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC; g) Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC; h) Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC; y i) Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC.
30
35

La memoria descriptiva describe el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la Denominación del Depósito de Patentes de la ATCC seleccionada entre: a) Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC; b) Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC; c) Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC; d) Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC; e) Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC; f) Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC; g) Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC; h) Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC; y i) Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC.
40
45

La presente memoria descriptiva describe un método para producir un anticuerpo para un polipéptido de IL-31 que comprende: inoculación de un animal con un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en: (a) un polipéptido que consiste en 9 a 141 aminoácidos, en el que el polipéptido es idéntico a una secuencia contigua de restos de los aminoácidos en SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 24 (Ser) hasta el número del aminoácido 164 (Thr); un polipéptido como se ha desvelado anteriormente; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 83-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 104-117; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 137-152; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 38-152; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 desde el número del aminoácido 24-164; (c) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 38-52; (d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 85-98; (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 104-118; (f) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 141-157; (g) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 38-157; (h) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 desde el número del aminoácido 24-163; (i) un polipéptido que comprende un epitopo antigénico de acuerdo con un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 11, en el que el perfil se basa en una ventana de seis restos de deslizamiento. Los
50
55
60
65

restos ocultos de G, S, y T y los restos expuestos de H, Y, y W se ignoraron; y en el que el polipéptido provoca una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo; y aislamiento del anticuerpo del animal.

5 La memoria descriptiva describe un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de neutralización) producido con el método que se ha desvelado anteriormente, en la que el anticuerpo se une a un polipéptido de la SEC ID N°: 2 o la SEC ID N°: 11. En una realización, el anticuerpo que se ha desvelado anteriormente se une de forma específica a un polipéptido mostrado en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 11.

10 La memoria descriptiva describe un método para detectar la presencia de IL-31 en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o aun fragmento de anticuerpo como se ha desvelado anteriormente, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la muestra biológica, y (b) detectar cualquiera del anticuerpo unido o fragmento de anticuerpo unido.

15 La memoria descriptiva describe un método para eliminar células cancerígenas que comprende la obtención de un tejido o muestra biológica *ex vivo* que contiene células cancerígenas de un paciente, o la identificación de células cancerígenas *in vivo*; producción de un polipéptido con el método como se desvela en el presente documento; formulación del polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable; y administración al paciente o exposición de las células cancerígenas al polipéptido; en el que el polipéptido elimina las células. En una realización, el método de eliminación de células cancerígenas es como se ha desvelado anteriormente, en el que el polipéptido se conjuga adicionalmente con una toxina. En una realización, el anticuerpo es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) anticuerpo policlonal, (b) anticuerpo monoclonal murino, (c) anticuerpo humanizado derivado de (b), (d) un fragmento de anticuerpo, y (e) anticuerpo monoclonal humano.

25 La memoria descriptiva describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une de forma específica a un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en: (a) el polipéptido mostrado a partir de los restos 38 (Val) a 152 (Leu) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (b) el polipéptido mostrado a partir de los restos 27 (Leu) a 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; (c) el polipéptido mostrado a partir de los restos 24 (Thr) a 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2; y (d) el polipéptido mostrado a partir de los restos 1 (Met) a 164 (Thr) como se muestra en la SEC ID N°: 2. En otra realización, el anticuerpo es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, etiqueta peptídica, partícula magnética, o toxina.

35 La memoria descriptiva describe un método para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 que comprende el cultivo de médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo como se desvelan el presente documento suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células hematopoyéticas en las células de médula ósea o de sangre periférica en comparación con células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor de citoquina soluble. En una realización, el método para la inhibición de la proliferación inducida por IL-31 or para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células hematopoyéticas y células precursoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el método para la inhibición de la proliferación inducida por IL-31 o para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

50 La memoria descriptiva describe un método para reducir la inflamación inducida por IL-31 que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de un anticuerpo como se desvela en el presente documento suficiente para reducir la inflamación.

55 La memoria descriptiva describe un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación que comprende: (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende un anticuerpo como se desvela en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel de administración posterior de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que una falta de aumento o una disminución del nivel de molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria. En una realización, el anticuerpo es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente un radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, etiqueta peptídica, partícula magnética, o toxina.

60 La memoria descriptiva describe un método para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 que comprende el cultivo de médula ósea o células de sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo como se desvelan el presente documento suficiente para reducir la proliferación o diferenciación de las células

hematopoyéticas en las células de médula ósea o de sangre periférica en comparación con células de médula ósea o de sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor de citoquina soluble. En una realización, el método para la inhibición de la proliferación inducida por IL-31 o para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células hematopoyéticas y células precursoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización, el método para la inhibición de la proliferación inducida por IL-31 o para la inhibición de la proliferación o diferenciación de células hematopoyéticas y precursores de células hematopoyéticas inducida por IL-31 es como se ha desvelado anteriormente, en el que las células linfoides son macrófagos o linfocitos T.

La memoria descriptiva describe un método para reducir la inflamación inducida por IL-31 que comprende administrar a un mamífero con inflamación una cantidad de una composición de un anticuerpo como se desvela en el presente documento suficiente para reducir la inflamación.

La memoria descriptiva describe un método para suprimir una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación que comprende: (1) determinar un nivel de una molécula inflamatoria; (2) administrar una composición que comprende un anticuerpo como se desvela en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable; (3) determinar un nivel de administración posterior de la molécula inflamatoria; (4) comparar el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (1) con el nivel de la molécula inflamatoria en la etapa (3), en el que una falta de aumento o una disminución en el nivel de molécula inflamatoria es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

La memoria descriptiva describe el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria en el que IL-31 desempeña un papel, que comprende: administración de un antagonista de IL-31 al mamífero de modo que la inflamación se reduce, en el que el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo o polipéptido de unión que se une de forma específica a un polipéptido o fragmento de polipéptido de IL-31 (SEC ID N°: 2). En una realización, el método para el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria es como se ha desvelado anteriormente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica. En otra realización, el método para el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria es como se ha desvelado anteriormente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria crónica seleccionada entre el grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria del intestino; colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; dermatitis atópica; eccema; y psoriasis. En otra realización, el método para el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria es como se ha desvelado anteriormente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda. En otra realización, el método para el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria es como se ha desvelado anteriormente, en el que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria aguda seleccionada entre el grupo que consiste en: endotoxemia; septicemia; síndrome del shock tóxico; y enfermedad infecciosa. En otra realización, el método para el tratamiento de un mamífero afectado con una enfermedad inflamatoria es como se ha desvelado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente a radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, etiqueta peptídica, partícula magnética, o toxina.

La memoria descriptiva describe la detección de inflamación en un paciente, que comprende: obtener una muestra de tejido o muestra biológica de un paciente; incubar la muestra de tejido o muestra biológica con un anticuerpo como se desvela en el presente documento en condiciones en las que el anticuerpo se une a su polipéptido complementario en la muestra de tejido o muestra biológica; visualizar el anticuerpo unido en la muestra de tejido o muestra biológica; y comparar los niveles de anticuerpo unido en la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con una muestra de tejido o muestra biológica de control normal, en el que un aumento en el nivel de anticuerpo unido a la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de tejido o muestra biológica de control normal es indicativo de inflamación en el paciente.

La memoria descriptiva describe la detección de inflamación en un paciente, que comprende: obtención de una muestra de tejido o muestra biológica de un paciente; etiquetar un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o el complemento de la SEC ID N°: 1; incubar la muestra de tejido o muestra biológica en condiciones en las que el polinucleótido se hibridará a la secuencia de polinucleótidos complementaria; visualizar el polinucleótido etiquetado en la muestra de tejido o muestra biológica; y comparar el nivel de hibridación de polinucleótido etiquetado en la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con una muestra de tejido o muestra biológica de control normal, en el que un aumento en la hibridación del polinucleótido etiquetado para la muestra de tejido o muestra biológica del paciente con respecto a la muestra de tejido o muestra biológica de control normal es indicativo de inflamación en el paciente.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

65

Generación de MAb de IL-31 de Rata Anti-Ratón*A. Inmunización e Identificación Sistemática de Suero de Ratas*

5 Cuatro ratas Sprague-Dawley embrague 3 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se inmunizaron con IL-31 de ratón. Las ratas se inmunizaron inicialmente mediante inyección intraperitoneal con ~290 ug de IL-31 de ratón recombinante, purificado (producido en células BHK) fusionado en el extremo C-terminal con un péptido que consiste en la secuencia EYMPME (SEC ID N°: 7) (denominada en lo sucesivo mL31-CEE) en combinación con Adyuvante de Freund Completo (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la inmunización inicial, cada una de las ratas recibió una cantidad adicional de 150 ug de mL-31-CEE en Adyuvante de Freund Incompleto a través de la vía intraperitoneal cada dos semanas durante un período de seis semanas. Siete días después de la tercera y cuarta inmunizaciones, se extrajo sangre a la ratas a través del plexo retroorbital y el suero se separó de la sangre para el análisis de su capacidad para unirse a mL-31-CEE en solución y para inhibir (cómo se mide mediante neutralización) la actividad estimula tu día de mL-31-CEE en una línea celular transfectar con el IL-31RA de ratón.

La capacidad de los anticuerpos de IL-31 de rata anti-ratón en los antisueros para unirse a mL-31-CEE se evaluó usando un ensayo de ELISA de estilo "captura". En este ensayo, los portillos de placas de poliestireno para ELISA de 96 pocillos se revistieron primero con 100 ul/pocillo de IgG de cabra anti-rata, anticuerpo específico para Fc (Jackson Immunoresearch) a una concentración de 500 ng/ml en Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6. Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C tras lo cual el anticuerpo sin unir se aspiró y las placas se lavaron dos veces con 300 ul/pocillo de PBS-Tween (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na₂HPO₄ 0,0072 M, KH₂PO₄ 0,0015 M, polisorbato 20 al 0,05 % en v/v, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 ul/pocillo de SuperBlock (Pierce, Rockford, IL) durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), el SuperBlock se retiró de la placa con golpecitos y el bloqueo se repitió una vez más tras lo cual las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween. Se prepararon diluciones en serie 10 veces (en PBS-Tween más albúmina de suero bovino al 1 % en p/v (BSA) y Proclin 300 al 0,05 % en v/v, pH 7,2 = tampón de dilución) de los sueros comenzando con una dilución inicial de 1:1000 variando a 1:1.000.000. A continuación, las muestras por triplicado de cada dilución se transfirieron a la placa de ensayo, 100 ul/pocillo, con el fin de unir la IgG de rata en los sueros a la placa de ensayo a través de la porción de Fc de la molécula. Los sueros de rata normal sirvieron como control negativo. Después de un periodo de incubación de 1 hora a TA, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se ha descrito anteriormente. A continuación se añadió a los pocillos mL-31-CEE biotinilado (proporción molar a 12:1 de biotina:proteína) a una concentración de 500 ng/ml, 100 ul/pocillo. Después de un periodo de incubación de 1 hora a TA, el mL-31-CEE biotinilado sin unir se aspiró de los pocillos y las placas se lavaron dos veces. A continuación se añadió a cada pocillo estreptavidina etiquetada con peroxidasa de rábano picante (Pierce, Rockford, IL) a una concentración de 500 ng/ml, 100 ul/pocillo, y las placas se incubaron a TA durante 1 hora. Después de la retirada del HRP-SA sin unir, las placas se lavaron 5 veces, se añadieron 100 ul/pocillo de tetrametil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo las placas se incubaron durante 5 minutos a TA. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 ul/pocillo de Reactivo de Parada TMB a 450 nm (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD). Y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un Instrumento Spectra MAX 340 de Molecular Devices a 450 nm.

La capacidad de los anticuerpos de IL-31 de rata anti-ratón en los antisueros para inhibir (como se mide mediante neutralización) la actividad estimuladora de IL-31 de ratón a través de su supuesto receptor se evaluó usando un ensayo de neutralización basado en células que usaba una línea de células Baf3 transfectadas con mL-31RA/OSMRbeta con sistema indicador de luciferasa (Baf3/KZ134/mcytor17/mOSMRbeta) y se podía activar a través de estimulación de las células con IL-31 de ratón. Para este ensayo, se preparó una dilución inicial a 1:250 en medio de ensayo (RPMI 1640, FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, penicilina-estreptomomicina-neomicina a 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA)) de cada antisuero y a continuación cada una de estas se diluyó en serie 2 veces hasta una dilución final de 1:32000. A cada dilución de antisueros se añadió un volumen igual de mL-31-CEE diluido a 4 ng/ml en tampón de ensayo para un volumen total de 100 ul en los pocillos. Las mezclas de anticuerpo/citoquina se incubaron a TA durante 0,5 horas tras lo cual las células diana se lavaron a partir de su medio de crecimiento, gustado a una densidad de 300.000 células/ml y se añadieron a las mezclas de anticuerpo/citoquina, 100 ul/pocillo. Los medios de ensayo que contenían 2 ng/ml de mL-31 y ningún antisuero sirvieron como un control negativo e indicaban la estimulación máxima que se podría conseguir en el ensayo. Después de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 16-24 horas las placas centrifugaron a 1500 RPM durante 5 minutos, el medio se retiró cuidadosamente con golpecitos y se añadieron 25 ul tampón de lisis celular a 1x (Promega, Madison, WI) a cada pocillo. Las placas se agitaron suavemente durante 10 minutos a TA para permitir la lisis celular completa y a continuación los lisados celulares se transfirieron a placas de 96 pocillos de color blanco sólidas (Corning/Costar 3917, Acton, MA). Se añadieron 40 ul de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a cada pocillo. A continuación los pocillos se evaluaron para actividad de luciferasa (que representa la activación de IL-31 del constructo indicador de STAT) en un luminómetro usando un intervalo de integración de 5 segundos.

Tanto el ensayo de ELISA de "captura" así como el ensayo de neutralización basado en células indicaban que las cuatro ratas desarrollaron una respuesta de la anticuerpo significativa con respecto a mL-31 aunque una rata género claramente una respuesta más fuerte que las otras. En general, la respuesta tal como se mide con el ELISA de "captura" iba casi en paralelo con el observado con el ensayo de neutralización basado en células lo que sugiere

que el anticuerpo de la clase de IgG era responsable principalmente de la inhibición de mL-31.

B. Fusión

5 Cuatro semanas después de la última inmunización intraperitoneal, la rata con la titulación de neutralización de mL-31 más significativas se inmovilizó una última vez con aproximadamente 150 ug de mL-31-CEE en PBS mediante inyección intravascular. Cinco días más tarde, el bazo y los nódulos linfáticos de esta rata se recogieron, se prepararon en un sola suspensión celular y se fusionaron con la línea de células de mieloma de ratón Sp2/0 (Shulman, M. *et al.*, Nature 276: 269-270, 1976) a una proporción de células linfóide:células de mieloma a 4:1 con
 10 PEG 1500 usando métodos convencionales conocidos en la técnica (Harlow, E. y Lane, D. 1988. "Antibodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). La mezcla de fusión se distribuyó en una serie de placas de fondo plano de 96 pocillos en combinación con timocitos de BALB/c como una capa de alimentación (Oi, V.T. y Herzenberg, L.A.. 1980. "Selected Methods in Cellular Immunology", B.B. Mishell y S.M. Shiigi, eds., pp. 351-372, Freeman, San Francisco). Los pocillos de las placas de fusión se alimentaron una vez con una sustitución del medio de un 70 % y los timocitos después de 4 días y de nuevo dos días más tarde solamente con medio. Los pocillos se sometieron a ensayo ocho días después de la siembra de la fusión.

C. Identificación sistemática de la Fusión

20 El ELISA de "captura" para mL-31 como se ha descrito anteriormente se usó como la identificación sistemática primaria excepto en que los sobrenadantes de hibridoma se sometieron a ensayo sin diluir y se replicaron en placas sobre las placas de ensayo a partir de las placas de cultivo. Se identificaron aproximadamente 170 pocillos positivos. Los sobrenadantes de cada uno de estos pocillos, así como unos cuantos pocillos negativos se evaluaron a continuación para su capacidad para inhibir a mL-31 en el ensayo de neutralización basado en células que se ha
 25 descrito anteriormente. Cada uno se sometió a ensayo a una dilución final a 1:8 en medio de ensayo. En la última dilución, los componentes estimulatorios no específicos en los sobrenadantes de hibridoma se redujeron suficientemente de modo que éstos representaban una contribución mínima al índice de estimulación observado. Parecía que una mayoría de los sobrenadantes neutralizaba a mL-31 hasta cierto punto con aproximadamente diez de ellos demostrando neutralización básicamente completa y el resto presentando un continuo de inhibición hasta un
 30 punto en el que parecía que aproximadamente otros diez poseían un potencial muy pequeño incluso ninguna neutralización. Las células de hibridoma en aproximadamente 150 de los pocillos positivos para ELISA de "captura" se expandieron de forma satisfactoria en cultivo en placas de 24 pocillos. Cuando la densidad de los cultivos de 24 pocillos era aproximadamente de $4-6 \times 10^5$ células/ml, el sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) se recogía individualmente y se almacenaba para cada pocillo y las células de cada pocillo se crioconservaban.

35 Cada uno de los sobrenadantes de los 24 pocillos se volvió a analizar en los ensayos de neutralización de IL-31 basados tanto en ELISA de "captura" como en neutralización basada en células usados en la identificación sistemática de fusión. Además, estos sobrenadantes también se sometieron a ensayo en un ELISA de "captura" usando el homólogo humano de IL-31 también construido con la etiqueta de EYMPME (SEC ID N°: 7) fusionada con el extremo C-terminal de la molécula de IL-31 y producido en células BHK. Los resultados indicaban que después de la expansión, una mayoría de los sobrenadantes del pocillo maestro habían retenido su capacidad para reconocer a IL-31 de ratón en solución. Entre estos pocillos positivos de ensayos de "captura", la actividad de inhibición de mL-31 variaba de completa a casi completa para aproximadamente 20 sobrenadantes hasta básicamente ninguna inhibición para 10-15 sobrenadantes. No se observó reactividad cruzada para IL-31-CEE humana en el ensayo de
 45 captura lo que indica que ninguno de los anticuerpos de rata anti-mL-31 reaccionaban de forma cruzada con el homólogo de IL31 humana o reconocieron la etiqueta de CEE fusionada al extremo C-terminal de la molécula de mL-31-CEE.

D. Selección y Clonación de Hibridomas que Producen Mab Anti-mL31 de Neutralización

50 Las células en siete de los principales diez pocillos maestros de neutralización de IL-31 (271.5.7, 271.9.4, 271.26.6, 271.27.4, 271.33.1, 271.33.3 y 271.39.4) se clonaron con el fin de aislar un hibridoma clonado que producía el mAb de neutralización de interés. Las células se clonaron en presencia de timocitos en placas de cultivo celular de microtitulación de 96 pocillos usando un enfoque de dilución convencional de baja densidad (menos de 1 célula por pocillo) y la monoclonalidad se evaluó mediante examen microscópico de pocillos para un solo foco de crecimiento antes del ensayo. Seis días después de la siembra, todos los pocillos en las placas se cribaron con el ELISA de "captura" para IgG específica de mL-31. El sobrenadante de 6-10 pocillos que era positivo tanto para mAb específico como originado a partir de los pocillos solamente con una sola colonia de crecimiento de hibridoma se recogió a partir de cada conjunto de clonación y se volvió a criba a diversas diluciones en el ELISA de "captura" así como el ensayo de neutralización basado en células para identificar un mAb de la "mejor" neutralización que produce clon. Los resultados de estos ensayos indicaban que el mAb de neutralización apropiado que producir clones de hibridoma se obtuvieron solamente en los conjuntos 271.9.4, 271.26.6, 271.33.1, 271.33.3 y 271.39.4. Un "mejor" clon en cada uno de estos conjuntos se volvió a clonar y los subclones se cribaron como se ha descrito para producir las líneas de hibridoma final, 271.9.4.2.6, 271.26.6.6.1, 271.33.1.2.2, 271.33.3.2.1 y 271.39.4.6.5. El isotipo de IgG de rata del mAb producido con cada uno de estos hibridomas se determinó usando un ELISA que usaba mAb específicos de isotipo de IgG de ratón anti-rata biotinilado. Se encontró que los cinco mAb pertenecían a la subclase

de IgG1. El hibridoma 271.26.6.6.1 se depositó en el depósito de patentes de la Colección Americana de Tejidos Tipo (ATCC, Manassas, VA) como un depósito original bajo el Tratado de Budapest y se proporcionó el N° PTA-6874 de Registro en la ATCC.

- 5 Cada uno de los mAb de IL-31 anti-ratón totalmente clonados que producen hibridomas se adaptaron para que crecieran en medio sin suero de hibridoma (Hibridoma-SFM, Invitrogen). El sobrenadante de los cultivos de alta densidad celular cultivados en Hibridoma-SFM se centrifugó para retirar las células y los residuos celulares, se filtró a través de un filtro de 0,2 μm y el mAb se purificó mediante cromatografía con proteína G usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

10

E. Clasificación de la Actividad de Neutralización Específica In Vitro de los Mab

- Para clasificar la actividad de neutralización específica *in vitro* de cada uno de los cinco mAb de IL-31 de rata anti-ratón, cada uno de los mAb purificados se volvió a someter a ensayo en el ensayo de neutralización basado en células que se ha descrito anteriormente con la excepción de que mL-31 se añadió primero a las células y esta mezcla se añadió a continuación los anticuerpos. Además de neutralizar la actividad frente a mL-31-CEE, los mAb también se evaluaron frente a otra forma de IL-31 de ratón, denominada c108smlL-31, en la que el resto de cisteína en la posición 108 se había convertido en un resto de serina. El último material se produjo en *E. coli* sin el péptido C-EE. Ambas formas de mL-31 se usaron una concentración final de 1 ng/ml y 5 ng/ml. Los mAb se ajustaron a una concentración de 20 ug/ml en medio de ensayo y se sometieron al ensayo por duplicado como diluciones en serie 10 veces que variaban de 10 ug/ml a 0,00001 ug/ml de concentración final en la mezcla de ensayo. Los valores de CI50 se determinaron usando el software Softmax (Molecular Devices). Los resultados se muestran en la Tabla 1 y muestran que los mAb 271.26.6.6.1, 271.33.1.2.2 y 271.39.4.6.5 eran los mAb de neutralización más potente y tenían una potencia similar en este ensayo *in vitro*. De forma interesante, el mAb 271.33.3.2.1 era mucho menos eficaz que nosotros mAb frente a la versión c108smlL-31 de mL-31 lo que apoya la conclusión a partir de los estudios de clasificación de epítipo de que este anticuerpo con toda probabilidad tiene una especificidad de epítipo diferente que los otros cuatro mAb. El hecho de que este mAb también era mucho menos eficaz frente a la versión c108smlL-31 de IL-31 en comparación con la versión de mL-31-CEE sugiere que el epítipo reconocido por 271.33.3.2.1 podría implicar parcialmente un sitio de glicosilación en la molécula de IL-31.

30 Tabla 1: Actividad de Neutralización Basada en Células *In Vitro* de los MAb de IL-31 de Rata Anti-Ratón

versión mL-31	Conc. (ng/ml)	CI ₅₀ (ng/ml) para los mAb				
		271.9.4.2.6	271.26.6.6.1	271.33.1.2.2	271.33.3.2.1	271.39.4.6.5
mIL31-CEE	1	11	3	2	13	2
	5	30	14	13	36	12
c108smlL31	1	96	11	7	1248	9
	5	190	43	33	2551	40

Ejemplo 2

Generación de los mAb de IL-31 Anti-Humana de Ratón

35

A. Inmunización e Identificación Sistemática de Suero de Ratones

- Dos grupos de ratones BALB/c embrague seis a ocho semanas de edad, con cinco animales cada uno, se inmunizaron con IL-31 humana. Los ratones en el Grupo 1 se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal de IL-31 humana recombinante, purificada fusionada con el extremo C-terminal con un péptido que consiste en la secuencia EYMPME (SEC ID N°: 7) (denominada IL-31-CEE en lo sucesivo) en combinación con adyuvante de Ribi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta proteína se produjo en células BHK. Los ratones en el Grupo 2 se inmunizaron del mismo modo con una forma mutada de IL-31 humana recombinante, purificada en la que el resto de cisteína en la posición 108 se había convertido en un resto de serina (en lo sucesivo denominado c108sIL-31). Este material se produjo en *E. coli* sin el péptido C-EE. Todos los ratones recibieron 50 ug de proteína cada dos semanas durante un periodo de 10 semanas. De siete a diez días después de la tercera y cuarta inmunizaciones, se extrajo sangre a los ratones a través del plexo retroorbital y el suero se separó de la sangre para análisis de su capacidad para inhibir la unión y posterior actividad estimuladora de IL-31 humana ha una línea celular transfectar con el IL-RA humana.

50

- La capacidad de los antisueros para inhibir la IL-31 humana se evaluó usando un ensayo de neutralización basado en luciferasa que usa IL-31-CEE o células c108sIL-31 y BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta (véanse los Ejemplos 3 y 4) con las siguientes modificaciones. Los antisueros individuales se valoraron por duplicado, a través de diluciones en serie 4 veces en una placa de poliestireno de color blanco, de fondo plano, de 96 pocillos (Corning/Costar 3917) partiendo de una dilución inicial a 1:250 de los antisueros en el tampón de ensayo (RPMI 1640, FBS al 10 %, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 ug/ml de sulfato de estreptomicina). En un intento para normalizar el efecto en cierto modo estimulador del suero de ratón en este ensayo, todas las diluciones excepto la dilución inicial a 1:250 se realizaron en tampón de ensayo más suero de ratón BALB/c normal

55

al 0,2 %. El volumen de los antisueros diluidos en cada pocillo era 100 ul. Las células se lavaron 1,5 veces en tampón de ensayo, se ajustó a una concentración de 3×10^6 /ml, se combinó con cualquiera de IL-31-CEE (100 pg/ml) o c108sIL-31 (30 pg/ml) y la mezcla se añadió a continuación a las placas, 100 ul/pocillo. El volumen de ensayo total era de 200 ul/pocillo que consiste en 30.000 células, IL-31 a una concentración final de 50 pg/ml (IL-31-CEE) o 15 pg/ml (c108sIL-31) y antisueros a una dilución final de 1:500, 1:2000, 1:8000, 1:32000, 1:128000, 1:512000, 1:2048000 y 1:8192000. Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 16-24 horas tras lo cual se centrifugaron a 1250 RPM durante 5 minutos, el medio se retiró cuidadosamente con golpecitos y se añadieron 25 ul de tampón de lisis celular a 1x a cada pocillo. Las placas se agitaron cuidadosamente durante 10 minutos para permitir la lisis celular tras lo cual se añadieron 40 ul de sustrato de ensayo de luciferasa a cada pocillo. Los pocillos se evaluaron a continuación para actividad de luciferasa (que representa la activación de IL-31 del constructo indicador de STAT) en un luminómetro usando un intervalo de integración de 4 segundos.

En general, se encontró que los antisueros de los ratones inmunizados con IL-31-CEE inhibía de forma eficaz la actividad estimuladora tanto de IL-31-CEE como de c108sIL-31 y viceversa, en este ensayo. Por esta razón, los ensayos de la neutralización adicionales normalmente se realizan solo con IL-31-CEE.

Los ratones con los títulos de neutralización más elevados se usaron para una serie de tres fusiones destinadas a generar hibridomas que producían anticuerpos monoclonales que podrían neutralizar de forma muy eficaz la interacción de IL-31 con su receptor homólogo.

B. Fusiones

Fusión 291

La primera fusión usó células de nódulos linfoides de un ratón inmunizado con IL-31-CEE y de un ratón inmunizado con c108sIL-31. Cada uno de estos animales se indemnizó una sexta de con 15 ug del respectivo inmunógeno diluido en PBS y se administró a través de inyección intravascular tres semanas después de su última inmunización. Tres días más tarde, el bazo y los nódulos linfáticos de estos ratones se extirparon, se combinaron, se procesaron en una sola suspensión celular (total de $4,69 \times 10^8$ células) y a continuación se fusionaron con un clon de la línea P3-X63-Ag8.653 de células de mieloma de ratón (Kearney, J.F. *et al.*, J Immunol. 123: 1548-50, 1979) (denominada P3-X63-Ag8.653.3.12.11) a una proporción de células linfoides:células de mieloma a 2.3:1 con 3 ml de PEG 1500 durante 2 minutos 55 segundos usando métodos convencionales conocidos en la técnica (Lane, R.D. J Immunol Methods 81: 223-8, 1985). La mezcla de fusión se distribuyó en una serie de placas de fondo plano de 96 pocillos, alimentadas una vez con una sustitución de medio de un 70 % después de 4 días y se sometió a ensayo 6 días más tarde.

Fusión 292

La segunda fusión usó células linfoides de un ratón inmunizado con IL-31-CEE. Además de las cinco inmunizaciones intraperitoneales mencionadas anteriormente, este ratón recibió una inyección intravascular de 15 ug de IL-31-CEE en PBS tres semanas después de la última inyección intraperitoneal y una inyección similar tres semanas después de la primera inmunización intravascular. Tres días más tarde, el bazo y los nódulos linfáticos se procesaron (total de $2,27 \times 10^8$ células) y se fusionaron con P3-X63-Ag8.653.3.12.11 a una proporción de células linfoides:células de mieloma a 2:1 con 1,8 ml de PEG 1500 durante 2 minutos 55 segundos como se ha descrito anteriormente. La mezcla de fusión se distribuyó en una serie de placas con fondo plano de 96 pocillos, alimentadas una vez con sustitución de medio de un 70 % después de 4 días y se sometió a ensayo 5 días más tarde.

Fusión 294

La última fusión usó células linfoides de un ratón inmunizado solamente con c108sIL-31. Además de las cinco inmunizaciones intraperitoneales con este antígeno que se ha descrito anteriormente, este ratón recibió una inyección intravascular de 15 ug de c108sIL-31 en PBS seis semanas después de la última inyección intraperitoneal y a continuación de nuevo dos semanas después de la primera inyección intravascular. Tres días más tarde, el paso de los nódulos linfáticos se procesaron (total de $1,586 \times 10^8$ células) y se fusionaron con P3-X63-Ag8.653.3.12.11 a una proporción de células linfoides:células de mieloma a 2:1 con 1,5 ml de PEG 1500 durante 2 minutos 55 segundos como se ha descrito anteriormente. La mezcla de fusión se distribuyó en una serie de placas con fondo plano de 96 pocillos, alimentadas dos veces con sustitución de medio de un 70 % después de 4 días y 6 días y se sometió a ensayo 3 días después de la última alimentación.

C. Cribado de Fusiones

Las tres fusiones se cribaron usando el ensayo de neutralización de IL-31 basado en células que se ha descrito anteriormente con dos modificaciones. En primer lugar, en lugar de diluir antisueros en las placas de ensayo, 100 ul de sobrenadante de cada uno de los pocillos en las placas de fusión se replicaron en placas sobre las placas de ensayo. En segundo lugar, la concentración final de IL-31-CEE en la mezcla de ensayo era 150 pg/ml.

Además del ensayo de neutralización, varias placas de cada fusión, elegidas al azar, se cribaron para anticuerpos de IgG que se podrían unir a IL-31-CEE que se había adsorbido previamente sobre placas de poliestireno para ELISA. La finalidad de este ensayo era identificar pocillos maestros que contenían un hibridoma que producía un anticuerpo anti-IL31 que o bien neutralizaba a IL-31 escasamente o bien fallaba en la neutralización de esta citoquina. En este ensayo, los pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos para ELISA se revistieron inicialmente con 50 ul/pocillo de IL31-CEE a una concentración de 200 ng/ml en Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6. Las placas se incubaron durante una noche a 4 °C tras lo cual el antígeno no unido se aspiró y las placas se lavaron dos veces con 300 ul/pocillo de PBS-Tween (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na₂HPO₄ 0,0072 M, KH₂PO₄ 0,0015 M, polisorbato 20 al 0,05 % en v/v, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 ul/pocillo de PBS-Tween + BSA al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). A continuación, la solución de bloqueo se retiró de las placas con golpecitos y 50 ul de medios acondicionados de cada pocillo de las placas de fusión se replicaron en placas en los pocillos de la placa de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a TA tras lo cual el anticuerpo sin unir se aspiró y las placas se lavaron dos veces con 300 ul/pocillo de PBS-Tween. Los antisueros específicos de Fc, IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyeron a 1:5000 en PBS-Tween + BSA al 1 % y se añadieron a los pocillos de las placas de ensayo, 100 ul/pocillo. Después de un periodo de incubación de 1 hora a TA, el anticuerpo de la segunda etapa sin unir se aspiró de los pocillos y las placas se lavaron 5 veces. A continuación, se añadieron 100 ul/pocillo de tetrametil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 5 minutos a TA. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 ul/pocillo de Reactivo de Parada TMB a 450 nm (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento Spectra MAX 340 de Molecular Devices a 450 nm.

Los resultados de los ensayos de neutralización mostraban que 52 y 139 pocillos en Fusión 291 y 292, respectivamente, contenían un anticuerpo que inhibía al menos un 40 % de la actividad estimuladora de IL-31. Una definición de positividad más rigurosa se aplicó a la fusión 294 en la que se observó que 131 pocillos contenían un anticuerpo que inhibía al menos un 70 % de la actividad de IL-31. Los resultados de los ensayos de ELISA para detectar los mAb que se unían a IL-31-CEE indicaban que una mayoría de los casos, si se encontraba un pocillo maestro que contenía un anticuerpo de IgG que se unía al IL-31-CEE, este también contenía un anticuerpo que inhibía a IL-31-CEE en el ensayo de neutralización basado en células. Sin embargo, había algunos pocillos que eran positivos en el ensayo de ELISA pero que presentaban una capacidad inhibitoria relativamente débil en el ensayo de neutralización basado en células y se reservaron para análisis posterior como se describe a continuación.

Las células de hibridoma que crecen en los pocillos maestros positivos se expandieron en cultivo en placas de 24 pocillos. Cuando la densidad de los cultivos de 24 pocillos era aproximadamente 4-6 x 10⁵ células/ml, el sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) se recogía individualmente y se almacenaba para cada pocillo y las células de cada pocillo se crioconservaban.

D. Selección y Clonación de Pocillos Maestros para Aislar Hibridomas Que Producen MAb de Neutralización de IL-31 Potentes

Cada uno de los nuevos sobrenadante de los 24 pocillos se volvió a analizar para capacidad de neutralización de IL-31 usando el ensayo de neutralización de IL-31 basado en células usado en la identificación sistemática de fusión. Cada sobrenadante se desarrolló sin diluir y por duplicado. Los resultados indicaban que después de la expansión, una mayoría de los sobrenadantes del pocillo maestro habían retenido una capacidad inhibitoria igual o mejor que la observada en la identificación sistemática maestra original. Para determinar mejor cuál de los nuevos sobrenadantes del pocillo maestro poseía la capacidad inhibitoria más elevada, esos sobrenadantes que demostraban una inhibición de IL-31-CEE de aproximadamente un 90 % o superior en este ensayo se volvieron a analizar mediante diluciones de ensayo del sobrenadante en el ensayo de neutralización basado en células. Se realizó una valoración de los sobrenadantes mediante diluciones en serie 3 veces en medios de difusión en las placas de ensayo para producir 100 ul en cada pocillo de las siguientes diluciones: puro, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243 y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente para la identificación sistemática de fusión. Aunque este ensayo identificaba claramente los sobrenadantes con la mayor capacidad de inhibición, era incapaz de determinar los que presentaban la actividad específica más elevada porque se desconocía la concentración de anticuerpo anti-IL31 en los sobrenadantes.

Para abordar el asunto de la concentración del anticuerpo específico, cada uno de los sobrenadantes se sometió a ensayo en formato de valoración, usando diluciones en serie bien 2 deceso 4 veces, en IL-31-CEE en el ensayo de ELISA directo que se ha descrito anteriormente. Después de la representación de los datos en Microsoft EXCEL, se determinó la dilución del sobrenadante que proporcionaba la mitad de la densidad óptica máxima (DO) observada en el ensayo que a su vez proporcionaba algún indicio de la concentración relativa de anticuerpo anti-IL-31 en el sobrenadante.

Mediante la combinación de los datos del ensayo de neutralización con los del ensayo de ELISA, se estableció una actividad específica relativa para cada sobrenadante y se identificaron los veinte pocillos maestros que contenían la actividad específica de neutralización anti-IL-31 más elevada. De modo interesante, todos los pocillos maestros de neutralización de anti-IL-31 más potente se obtuvieron a partir de la fusión 292. En los datos de neutralización para estos pocillos maestros se observaba en los datos de neutralización para estos pocillos maestros que, aunque se

consiguió la inhibición máxima de IL-31 para cada sobrenadante en estado puro y con una dilución a 1:3, el grado absoluto de neutralización era ligeramente superior para unos sobrenadantes que para otros como se refleja en los recuentos de unidades de luciferasa relativa ligeramente más bajos. Esto se interpretó como grados ligeramente diferentes de neutralización "completa" de IL-31. Mediante el acoplamiento de esta observación con la actividad específica de neutralización relativa para cada pocillo maestro, la lista de los veinte pocillos maestros de neutralización más potente se redujo a los mejores diez aparentes. Estos incluían 292.12, 292.39, 292.51, 292.63, 292.64, 292.72, 292.84, 292.105, 292.109 y 292.118.

Las células en cada uno de estos diez mejores pocillos maestros de neutralización de IL-31 se clonaron con el fin de aislar un hibridoma tronado que producía el mAb de neutralización de interés. Las células se clonaron en placas de cultivo celular de microtitulación de 96 pocillos usando un enfoque de dilución convencional de baja densidad (menos de 1 célula por pocillo) y la monoclonalidad se evaluó mediante examen microscópico de pocillos para un solo foco de crecimiento antes del ensayo. El medio de clonación consistía en medios de fusión que carecían del componente HAT (IMDM, suero de FC1 al 10 %, L-glutamina 2 mM, 1X de penicilina/estreptomina, factor de clonación de hibridoma al 10 % (Roche Applied Science). De seis a ocho días después de la siembra, los sobrenadante desde todos los pocillos se cribaron mediante ELISA en IL-31-CEE unido a la placa. Las células de 4-6 pocillos en cada conjunto en el que el sobrenadante eran fuertemente positivas para el mAb específico y en el que parecía que solamente se trataba de una colonia individual de crecimiento de hibridoma se expandieron en cultivos de 24 pocillos y dio como resultado sobrenadantes que se volvieron a someter a ensayo con ELISA en IL-31-CEE unido a Plata y mediante el ensayo de neutralización de IL-31 basado en células. Basándose en estos resultados, el clon de neutralización más potente aparente en cada conjunto se volvió a clonar y se cribó mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. Si un 95 % o más de los pocillos con crecimiento positivo también eran positivos para mAb específico, los esfuerzos de subclonación adicionales se consideraban innecesarios y los hibridomas se declaraban clonales. Solamente para un pocillo maestro, 292.64, se realizó una segunda ronda de subpronación necesaria para conseguir el porcentaje deseado de positividad de mAb específica entre los clones resultantes. Las células de 5-6 pocillos en cada conjunto de subclón final en el que el sobrenadante era fuertemente positivo para mAb específico y en el que parecía que solamente había una sola colonia de crecimiento de hibridoma se expandieron en cultivos de 24 pocillos. Cada uno de los clones de hibridoma se adaptó a continuación para que creciera en medios que carecían de factor de clonación de hibridoma (IMDM, suero de FC1 al 10 %, L-glutamina 2 mM, 1X de pe penicilina/estreptomina) mediante separación de células en el último medio cuando la densidad celular era apropiada. Después de la adaptación, el sobrenadante se recogió de los subclones en cada conjunto y se cribó mediante ELISA en IL-31-CEE unido en placa. Basándose en la titulación con respecto a la densidad celular en el momento de la recogida del sobrenadante, se eligió un "mejor" clon final que conducía a la selección del siguiente grupo de clones finales: 292.12.3.1; 292.39.5.3; 292.51.5.2; 292.63.5.3; 292.64.6.5.5; 292.72.3.1; 292.84.1.6; 292.105.4.1; 292.109.4.4; y 292.118.6.4.

El isotipo de IgG de ratón del mAb producido con cada uno de estos hibridomas se determinó usando el ensayo IsoStrip de Anticuerpo Monoclonal de Ratón (Roche Applied Science). Se encontró que todos los mAb pertenecían a la subclase de IgG1 excepto para 292.72.3.1 y 292.84.1.6 que se mostró que pertenecían a la subclase de IgG2a.

E. Actividad de Neutralización Específica *In Vitro* de Clasificación de Mab de Neutralización de IL-31 Potentes

Para clasificar la actividad de neutralización específica *in vitro* de los diez mAb de IL-31 anti-humanos de ratón potentes, el sobrenadante agotado de cada uno de los clones de la primera ronda se volvió a someter a ensayo en el ensayo de neutralización basado en células ese descrito anteriormente. En primer lugar, la cantidad de IgG en cada sobrenadante se determinó mediante análisis de HPLC en una columna de proteína G usando un mAb de concentración conocida como un patrón. Cada sobrenadante se diluyó a continuación hasta una concentración de IgG de 1 ug/ml en los mismos medios usados para generar el sobrenadante agotado. Los sobrenadante circuitos se valoraron a continuación mediante una diluciones serie 10 veces en medios para producir un intervalo de concentración de 1 ug/ml a 0,0001 ug/ml y se sometió a ensayo por triplicado en el ensayo de neutralización basado en células que se ha descrito anteriormente con la concentración final de IL-31-CEE ajustada a 300 pg/ml (18,27 pM). Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 2 con los mAb enumerados en orden a partir del más potente al menos potente. Los mAb 292.84.1 y 292.12.3 eran los agentes de neutralización más potentes seguidos a su vez por los mAb 292.72.3 y 292.63.5 que parecía que eran aproximadamente la mitad de potentes que los dos primeros. Se mostró que el resto de los mAb eran aproximadamente 6-9 veces menos potentes que los dos mAb mejores.

Tabla 2. Clasificación de los MAb de Neutralización Anti-IL31 Potentes mediante Actividad de Neutralización Específica *in vitro*

MAB	Cl ₅₀ (ng/ml)	Cl ₅₀ (pM)*
292.84.1	1,077 ± 0,021	7,18 ± 0,14
292.12.3	1,197 ± 0,044	7,98 ± 0,29
292.72.3	1,997 ± 0,027	13,31 ± 0,18

292.63.5	2,819 ± 0,034	18,79 ± 0,23
292.51.5	6,478 ± 0,130	43,19 ± 0,87
292.118.6	6,550 ± 0,154	43,67 ± 1,03
292.109.4	8,286 ± 0,151	55,24 ± 1,01
292.39.5	8,633 ± 0,481	57,55 ± 3,20
292.105.4	9,144 ± 0,281	60,96 ± 1,87
292.64.6	10,05 ± 0,295	67,00 ± 1,97
* usando un peso molecular de anticuerpo = 150.000 daltons		

Basándose en los resultados anteriores, los hibridomas 292.84.1.6, 292.12.3.1, 292.72.3.1, 292.63.5.3 y 292.118.6.4 se eligieron como representantes de los diferentes niveles de capacidad de neutralización específica a depositar con el depósito de patentes de la Colección Americana de Tejidos Tipo (ATCC, Manassas, VA) como un depósito original bajo el Tratado de Budapest y se les proporcionó los siguientes N^{os} de Registro en la ATCC: clon 292.12.3.1 (Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.72.3.1 (Denominación PTA-6816 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.63.5.3 (Denominación PTA-6829 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 292.118.6.4 (Denominación PTA-6830 del Depósito de Patentes de la ATCC); y clon 292.84.1.6 (Denominación PTA-6871 del Depósito de Patentes de la ATCC).

F. Selección y Clonación de Pocillos Maestros para Aislar Hibridomas que Producen MAb de Escasa Neutralización de IL-31

En la generación de mAb de IL-31 anti-humanos era de interés el aislamiento de pares de mAb que se podrían usar en un formato de ensayo de sándwich para cuantificar la cantidad de IL-31 en diferentes fluidos. Tales pares de mAb por lo general tienen especificidad para diferentes epítopos en la molécula diana y preferentemente no tienen competencia cruzada para la unión con esa molécula. Para aislar los pares candidatos de tales mAb, se eligió una estrategia para emparejar un mAb de neutralización de IL-31 excelente con uno que presentaba poco o ningún potencial de neutralización, suponiendo que todos de tales diferentes anticuerpos funcionales se unían con toda probabilidad a epítopos de no superposición (separados en el espacio).

Como se ha indicado anteriormente para las identificaciones sistemáticas de fusión, varias placas de cada fusión se cribaron mediante ELISA en IL-31-CEE unido a la placa para identificar sobrenadantes de pocillo maestro positivos para anticuerpo anti-IL-31. La comparación de los resultados de ELISA con los del ensayo de neutralización basado en células indicaban la presencia de pocillos maestros que contenían anticuerpo que se unía bien a IL-31-CEE pero no neutralizaban esta molécula muy bien en el ensayo de neutralización basado en células. Tal como se hizo con los pocillos maestros de neutralización más potentes, las células de hibridoma que crecían en estos pocillos maestros se expandieron en cultivo en placas de 24 pocillos. Cuando la densidad de los cultivos de 24 pocillos era aproximadamente $4-6 \times 10^5$ células/ml, el sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) se recogía individualmente y se almacenaba para cada pocillo y las células de cada pocillo se crioconservaban.

Estos nuevos sobrenadantes se sometieron a ensayo usando el ensayo de neutralización basado en células (diluciones en serie 3 veces partiendo de sobrenadante puro y evolucionando hasta una dilución final de 1:243) así como un ensayo de ELISA de estilo "captura" similar al usado en el desarrollo de los mAb de IL-31 de rata anti-murino con las siguientes diferencias; 1) IgG de oveja anti-ratón, anticuerpo específico para Fc (Jackson ImmunoResearch) (1 µg/ml) como anticuerpo de revestimiento de placa, 2) las placas se bloquearon una vez con PBS-Tween + BSA al 1 % durante 1 h, 3) una sola valoración de cada sobrenadante añadido a los pocillos (diluciones en serie 3 veces partiendo de sobrenadante puro y evolucionando hasta una dilución final de 1:2187), y 4) adición de IL-31-CEE biotinilado (proporción molar a 3:1 de biotina:proteína), 200 ng/ml. Se observó que este ensayo era más relevante que la unión del anticuerpo al IL-31-CEE unido a la placa ya que se evaluó la capacidad del anticuerpo para unirse a IL-31-CEE en solución, una propiedad esencial para un buen anticuerpo para ELISA de estilo sándwich. De hecho, se observó que un número de los sobrenadantes de los pocillos maestros que contenían anticuerpo que se unía bien a IL-31-CEE unido a la placa reconocían escasamente esta molécula de solución.

Para elegir a partir de qué pocillos clonar hibridomas que secretan anticuerpo apropiado, se identificaron 10 pocillos (291.78, 292.152, 292.154, 294.35, 294.144, 294.146, 294.154, 294.155, 294.158 y 294.163) cuyo sobrenadante neutralizaba a IL-31-CEE escasamente en el ensayo de neutralización (menos de un 50 % pero preferentemente solamente un 1-20 %) y también se unían relativamente bien a IL-31-CEE en solución (como se indica mediante una DO superior a 2,0 a concentración pura de sobrenadante). Se realizó clonación, identificación sistemática de clones, y selección de un mejor clon de primera ronda como se ha descrito anteriormente para los pocillos de neutralización potente.

Para reducir el número de hibridomas que entran en la subclonación adicional, se realizaron dos nuevos ensayos con sobrenadante agotado a partir de cada uno de los clones seleccionados de la primera ronda. La primera

evaluación fue un intento de agrupar los mAb sobre la base de especificidad de epítipo ("clasificación") usando el instrumento de resonancia de plasmones superficiales Biacore 3000. Uno de los sobrenadantes de mAb de buena neutralización (292.64.6) y los 10 sobrenadantes de clon de primera ronda con neutralización más deficiente se realizaron los unos frente a los otros y dio como resultado la identificación de cuatro "grupos" aparentes. El grupo 1 consistía solamente en el anticuerpo de buena neutralización. El grupo 2 estaba formado por 292.152.4, 292.154.4, 294.35.2, 294.146.5 y 294.154.5. El grupo 3 incluía a 291.78.4, 294.155.6, 294.158.5 y 294.163.2. El grupo 4 contenía solamente a 294.144.3. El segundo ensayo implicaba una repetición del ELISA de estilo "captura" solamente esta vez, debido a una concentración de anticuerpos específicos más elevada en los sobrenadantes en comparación con los sobrenadante es originales original del cultivo de 24 pocillos maestro, se obtuvo una curva de valoración completa y se permitió la determinación de una CE₅₀ para unión de anticuerpo a IL-31-CEE. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (junto con los resultados de clasificación y el % de inhibición de la actividad de IL-31-CEE en el ensayo de neutralización basado en células) y se indicaba que había un amplio intervalo en los valores de CE₅₀ (y por deducción, afinidad de los mAb para IL-31-CEE) de los diversos mAb.

Tabla 3. Resumen de datos para Sobrenadante de Cultivo de Clon de Primera Ronda de Hibridomas de Neutralización de IL-31 Menos Potentes

MAB	Grupo de Epítipo (Biacore)	CE ₅₀ (ng/ml) para captura de IL31-CEE	% de Neutralización de actividad de IL31 en ensayo basado en células (sobrenadante sin diluir)
291.78.4	3	10	94
292.152.4	2	182	25
292.154.4	2	57,7	76
294.35.2	2	22,2	82
294.144.3	4	13,4	75
294.146.5	2	10,2	94
294.154.5	2	15,8	88
294.155.6	3	172	53
294.158.5	3	119	31
294.163.2	3	24,2	47
292.64.6	1	3,4	100

Haciendo énfasis en la selección de hibridomas que producen mAb que estaban 1) en grupos de epítipo diferentes de los de un mAb de buena neutralización (292.64.6) y 2) de la afinidad más elevada como se indica con una CE₅₀ baja en el ensayo de estilo de captura, solamente se llevaron hasta un estado de que un final los clones de primera ronda, 294.35.2, 294.144.3, 294.154.5 y 294.163.2, como se ha descrito anteriormente para los mAb de neutralización más potente. Este esfuerzo de subclonación adicional proporcionó la selección del siguiente grupo de clones finales: 294.35.2.6.3; 294.144.3.5; 294.154.5.6; y 294.163.2.1.

El isotipo de IgG de ratón del mAb producido con cada uno de estos hibridomas se determinó usando el ensayo IsoStrip de Anticuerpo Monoclonal de Ratón (Roche Applied Science). Se encontró que los cuatro mAb pertenecían a la subclase de IgG1. Las muestras de cada uno de los cuatro hibridomas se depositaron en el depósito de patentes de la Colección Americana de Tejidos Tipo (ATCC, Manassas, VA) como un depósito original bajo el Tratado de Budapest y se les proporcionaron los siguientes N^{os} de Registro en la ATCC: clon 294.163.2.1 (Denominación PTA-6831 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 294.35.2.6.3 (Denominación PTA-6872 del Depósito de Patentes de la ATCC); clon 294.154.5.6 Denominación PTA-6875 del Depósito de Patentes de la ATCC); y clon 294.144.3.5 (Denominación PTA-6873 del Depósito de Patentes de la ATCC).

G. Reacción Cruzada de mAb de IL-31 Anti-Humana de Ratón con IL-31 de ratón

Todos los sobrenadantes de clon de primera ronda de los diez mAb de neutralización más potente así como los diez mAb de neutralización menos potente se sometieron a ensayo por su capacidad para reconocer IL-31 de ratón mediante ELISA en mL-31-CEE unido a placa. No se observó reactividad cruzada con ninguno de los mAb, lo que indica que parece que los mAb tienen especificidad hacia IL-31 humana. Además, estos resultados mostraban que ninguno de los anticuerpos reconocidos por la etiqueta peptídica de CEE comunes para el extremo C-terminal de las moléculas recombinantes de IL-31 tanto humana como de ratón usadas en estos estudios, una determinación que no se realizó en los sobrenadantes del pocillo maestro original.

Ejemplo 3

Ensayo de Luciferasa receptora de IL-31RA/OSMRbeta

El plásmido KZ134 se construyó con oligonucleótidos complementarios que contenían elementos de unión al factor de transcripción STAT de 4 genes, que incluye un elemento inducible de c-fos Sis modificado (m67SIE, o hSIE) (Sadowski, H. *et al.*, Science 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. *et al.*, Science 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de glándula mamaria del gen de la β -caseína (Schmitt-Ney, M. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991), y un elemento inducible de STAT del gen Fcg RI, (Seidel, H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles con Asp718-XhoI y se ligaron, usando métodos convencionales, en un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor de c-fos (Poulsen, L.K. *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contenía un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar células BaF3 de forma estable, usando métodos de transfección convencional y selección, para preparar la línea de células BaF3/KZ134.

Se construyó una línea de células indicadoras BaF3/KZ134, que expresa el receptor IL-31RA o IL-31RA/OSMRbeta de longitud completa. Los clones se diluyeron, se sembraron y se seleccionaron usando técnicas convencionales. Los clones cribaron mediante ensayo de luciferasa (véase B, a continuación) usando el medio acondicionado de IL-31 humana o de proteína IL-31 purificada como un inductor. Se seleccionaron los clones con la respuesta de luciferasa más elevada (a través de luciferasa de STAT) y el fondo más bajo. Se seleccionaron líneas de células transfectantes estables. Las líneas celulares se denominaron BaF3/KZ134/IL-31RA o BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta dependiendo de los receptores transfectados en la línea celular.

De forma análoga, también se construyeron líneas de células BHK usando el método que se describe en el presente documento, y se usaron en ensayos de luciferasa que se describen en el presente documento. Las líneas celulares se denominaron BHK/KZ134/IL-31RA o BHK/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta dependiendo de los receptores transfectados en la línea celular.

Las células BaF3/KZ134/IL-31RA y BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta se centrifugaron y se lavaron en medios sin mL-3. Las células centrifugaron y se lavaron 3 veces para asegurar la retirada de mL-3. A continuación, se hizo recuento celular en un hemocitómetro. Las células se sembraron en un formato de 96 pocillos a aproximadamente 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l por pocillo usando el medio sin mL-3. El mismo procedimiento se usó para células BaF3/KZ134 sin transfectar para uso como un control en el ensayo posterior. Las células BHK/KZ134/IL-31RA o BHK/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta se sembraron en un formato de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo en 100 μ l de medios. Las células BHK/KZ134 precursoras se usaron como un control.

La activación de STAT de las células BaF3/KZ134/ IL-31RA, BaF3/KZ134/IL-31RA /OSMRbeta, BHK/KZ134/ IL-31RA, o BHK/KZ134/ IL-31RA /OSMRbeta se evalúa usando medios acondicionados o proteína purificada. Cien microlitros del medio acondicionado diluido o proteína se añaden a las células BaF3/KZ134/ IL-31RA, BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta, BHK/KZ134/IL-31RA, o BHK/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta. El ensayo que usa el medio acondicionado se realiza en paralelo en células BaF3/KZ134 o BHK/KZ134 sin transfectar como un control. El volumen total del ensayo es de 200 μ l. Las placas se incuban a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas momento en el que las células BaF3 se sedimentan por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, y el medio se aspira y se añaden 25 μ l de tampón de lisis (Promega). Para las líneas de células BHK, la etapa de centrifugación no es necesaria ya que las células son adherentes. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se miden para activación del constructo indicador de STAT leyéndolas en un luminómetro (Labsystems Luminoskan, modelo RS) que añadió 40 μ l de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a una integración de cinco segundos.

45 Ejemplo 4

Ensayo de Luciferasa en Líneas de Células Epiteliales Transformadas Humanas a través de Infección Transitoria con un Gen Indicador de STAT/SRE Adenoviral

La inhibición, reducción, y/o neutralización de la actividad de IL-31 se puede medir con el ensayo de luciferasa. Por ejemplo, las líneas de células transformadas humanas se pueden sembrar en placas de fondo plano de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en medios de crecimiento regular como ser específica para cada tipo de célula. Al día siguiente, las células se infectan con constructo indicador de adenovirus, KZ136, a una multiplicidad de infección de 5000. El indicador de KZ136 contiene los elementos de STAT además de un elemento de respuesta al suero. El volumen total es de 100 μ l/pocillo usando DMEM complementado con L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), Piruvato Sódico 1 mM (GibcoBRL) y suplemento de Insulina-Transferrina-Selenio a 1x (GibcoBRL) (en lo sucesivo en el presente documento denominado medio sin suero). Las células se cultivan durante una noche.

Al día siguiente, el medio se retira y se sustituye con 100 μ l de medio de inducción. El medio de inducción es IL-31 humana diluida en medios sin 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. Un control positivo de FBS al 20 % se usa para validar el ensayo y para asegurar que la infección con adenovirus es satisfactoria. Las células se inducen durante 5 horas momento en el que el medio se aspira. Las células se lavan a continuación en 50 μ l/pocillo de PBS, y posteriormente se lisan en 30 μ l/pocillo de tampón de lisis celular a 1X (Promega). Después de un periodo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se transfieren 25 μ l/pocillo de lisado a placas de 96 pozos pillos de color blanco opacas. A continuación, las placas se leen en el Luminómetro usando integración de 5 segundos con inyección de 40 μ l/pocillo de sustrato de luciferasa (Promega).

Ejemplo 5Inhibición de producción de Citoquina con Anticuerpos de IL-31

5 Se ha mostrado que IL-31 estimula la producción de IL-6 en DU145 (líneas de células enfermas y normales); así como que estimula líneas de células A549 (enfermas y normales) para estimular la producción de IL-8, y para reducir la producción de IL-8 en líneas de células U2OS (enfermas y normales). Véase la solicitud de Patente de Estados Unidos publicada (véase el número de publicación 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Como tal, la actividad de los anticuerpos monoclonales de IL-31 que se describen en el presente documento se puede medir mediante una inhibición, reducción, y/o neutralización de la actividad de IL-31 en estas líneas de células epiteliales de patología humana.

A. Inhibición de producción de Citoquinas con líneas de células epiteliales de patología humana cultivadas con IL-31 humana

15 Las células se siembran a una densidad de $4,5 \times 10^5$ células por pocillo en una placa de 6 pocillos (Costar) y se cultivan en los respectivos medios de crecimiento. Las células se cultivan con reactivos de ensayo; 100 ng/ml de IL-31 (con y sin estimulación con anticuerpo), 10 ng/ml de Interferón gamma (IFN gamma) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de Factor alfa de Necrosis Tumoral (TNF alfa) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de IL-1beta (R&D Systems, Minneapolis, MN) o 100 ug/ml de Lipopolisacárido (LPS) (Sigma). Los sobrenadantes se cosechan a las 24 y 48 horas y se someten a ensayo para citoquinas; GM-CSF (Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos-Macrófagos), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (Proteína 1 Quimioattractora de Macrófagos) y TNFa. Se usaron kits de Multiplex Antibody Bead de BioSource International (Camarillo, CA) para medir citoquinas en las muestras. Los ensayos se leen en un instrumento Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) y los datos se analizan usando el software MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). La producción de citoquinas (pg/ml) para cada línea celular se mide en las muestras de 24 horas.

B. Inhibición de producción de Citoquinas con líneas de células epiteliales humanas normales cultivadas con IL-31 humana

30 Las células se siembran a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se cultivan con reactivos de ensayo; 1000 ng/ml, 100 ng/ml y 10 ng/ml de IL-31 (con y sin estimulación con anticuerpo), 10 ng/ml de TNFa, 10 ng/ml de OSM, 10 ng/ml de IFNa, 10 ng/ml de TGFb o 10 ng/ml de Linfotactina. Los sobrenadantes se cosechan a las 24 y 48 horas y se someten a ensayo para citoquinas; IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1a, RANTES y Eotaxina. Las citoquinas se someten a ensayo como se ha descrito anteriormente. La producción de citoquinas (pg/ml) para cada línea celular se mide en las muestras de 48 horas.

C. Inhibición de producción de Citoquina con líneas de células epiteliales de patología humana cocultivadas con IL-31 humana e IFN gamma

40 Las células se siembran a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se cocultivan con 10 ng/ml de IFN gamma +/- IL-31 a 100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 y 48 horas y se sometieron a ensayo f (con y sin estimulación con anticuerpo), o IL-8 y MCP-1. La producción de citoquinas (pg/ml) para cada línea celular se mide en las muestras de 24 horas.

Ejemplo 6Inhibición de los efectos de IL-31 en la Adhesión de Monocitos U937 a Monocapa de Células Endoteliales de Médula Ósea Transformadas (TRBMEC)

50 Se ha mostrado que IL-31 puede producir sinergias que influye en la adherencia basal de células U937 a las monocapas endoteliales. En particular, la IL-31 en sinergia con TNF alfa y aumento adicional de adhesión a U937. Véase la solicitud de Patente de Estados Unidos publicada (véase el número de publicación 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Por lo tanto, la inhibición de IL-31 con los anticuerpos anti-IL-31 que se describen en el presente documento se puede medir con el siguiente ensayo.

60 Se siembran Células Endoteliales de Médula Ósea Transformadas (TRBMEC) en grupos de tejido de 96 ojillos (Falcon) a una densidad de 25.000/pocillo en medio M131 (Cascade Biologics) complementado con Suplemento de Crecimiento Microvascular (MVGS) (Cascade Biologics). En el momento de la confluencia (24 horas más tarde), las células se intercambian por M199 (Gibco-Life Technologies) complementado con Suero Bovino Fetal al 1 % (Hyclone). Se añade IL-31 recombinante humana (reactivo de ensayo) a diversas concentraciones (de 0,4 ng/ml a 10 ng/ml) con y sin estimulación de anticuerpo, para someter a ensayo el efecto de la proteína en interacciones de células inmunes-células endoteliales que dan como resultado adhesión. Algunos pocillos reciben 0,3 ng/ml de Factor de Necrosis Tumoral (TNF alfa de R&D Systems), una citoquina proinflamatoria conocida, además de IL-31, para someter al ensayo un efecto de la proteína en células endoteliales en condiciones de inflamación. El TNF alfa a 0,3 ng/ml, solo, se usa como control positivo y la concentración usada representa aproximadamente un 70 % del

efecto máximo del TNF alfa en este sistema, es decir, no induce adherencia máxima de células U937 (una línea de células similares a los monocitos humanos) al endotelio. Por esta razón, esta preparación puede detectar tanto regulación positiva como regulación negativa de los efectos del TNF alfa. Los niveles basales de adhesión tanto con TNF alfa como sin él se usan como una medida inicial para evaluar el efecto de los reactivos de ensayo.

5 Después de un periodo de incubación de las células endoteliales durante una noche con los reactivos de ensayo, las células U937, teñidas con marcador fluorescente de Calceína-AM 5 μ M (Molecular Probes), las células se suspenden en RPMI 1640 (sin rojo fenol) complementado con FBS al 1 % y se siembran a 100.000 células/pocillo en la monocapa de TRBMEC aclarada. Los niveles de fluorescencia en longitudes de onda de excitación/emisión de
10 485/538 nm (lector de microplacas de Molecular Devices, aplicación CytoFluor) se miden 30 minutos más tarde, antes y después del aclarado del pocillo tres veces con RPMI 1640 caliente (sin rojo fenol), para retirar el U937 no adherente. Los niveles de fluorescencia antes del aclarado (total) y después del aclarado (especifico para adherencia) se usan para determinar el porcentaje de adherencia (adherente neto/total neto \times 100 = % de adherencia).

15 Ejemplo 7

Protocolo de Bioensayo de IL-31

20 Las células BAF3 transfectadas con hzCYTOR17 (IL-31RA), hOSMRB, y KZ134 se cultivan a 5×10^5 células/ml y 1×10^6 células/ml. Las células se lavan con medio de ensayo (RPMI 1640, FBS al 10 %, L-Glutamina, Piruvato Sódico, y Pen/Estrep (todos de Gibco)) y se volvieron a suspender a 3×10^5 células/ml en medio de ensayo. En una placa opaca de 96 pocillos, los patrones de hIL-31 se titulan por duplicado de 600 pg/ml a 9,38 pg/ml en medio de ensayo mediante una dilución en serie a 1:2 de 100 μ l/pocillo. Se añaden patrones de control de calidad por
25 duplicado a la placa a 350 pg/ml y 35 pg/ml en 100 μ l. Las muestras de ensayo a menudo se diluyen a 1:2 o 1:4 y se añaden por duplicado a los pocillos de muestra. Se añaden 100 μ l de las células BAF3 lavadas y se añaden a cada pocillo para una concentración final de 3×10^4 células/pocillo. Las placas se incuban durante 16-24 horas a +37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. La placa se centrifuga a 1200 RPM durante 5 minutos, el medio se retira con golpecitos y se añaden 25 μ l/pocillo de tampón de lisis (Promega) a cada pocillo. Después de 10 minutos la placa se
30 lee en un luminómetro (Berthold). El luminómetro añade 40 μ l/pocillo de mezcla de sustrato de luciferasa (Promega) y la luminiscencia se integra durante un periodo de 4 segundos. Los valores de luminiscencia se exportan a una hoja de cálculo en la que se analizan y se convierten a picogramos de IL-31 por 10^6 células por ml de volumen.

35 Ejemplo 8

Método I de Implicación de IL-31 en el Inicio y Perpetuación de Hipersensibilidad por Contacto *In Vivo*

Los ratones BALB/c se pintan en la parte media del lomo rasurado con 25 μ l de DNFB al 0,5 % disuelto (2,4, dinitro-fluoro-benceno, Sigma, St. Louis MO) en una solución de acetona:aceite de oliva (4:1) usando una pipeta. Grupo de
40 control de vehículo recibe 25 μ l de acetona:aceite de oliva solamente. Después de 5 días, los ratones se anestesian con isofluorano en una cámara de inhalación y ambos pabellones auriculares de los animales experimentales y de control se miden con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición de la medida inicial. A continuación, los ratones se estimulan con la aplicación de 10 μ l de DNFB al 0,25 % en acetona:aceite de oliva (4:1) a ambos lados de cada oreja de todos los ratones. La hipersensibilidad por contacto se mide a las 24 h y 48 h más
45 tarde como la diferencia entre la oreja derecha (estimulada) y la oreja izquierda (sin estimular). Todas las medidas se realizan con un micrómetro de ingeniero. Los valores de fondo se determinan mediante la diferencia de la hinchazón en la oreja entre las orejas estimulada y sin estimular de ratones sin tratamiento previo.

Se toman muestras de sangre completa y suero para análisis de FACS y/o ELISA antes de sacrificar los animales y
50 las orejas se recogen para histología.

Método II (Induce respuestas de Th2)

Los ratones BALB/c se pintan en la parte media del lomo rasurado con 100 μ l de FITC al 0,5 % (isotiocianato de fluoresceína) en una solución a 1:1 de acetona/ftalato de dibutilo (MUDS disponible usando una pipeta los días 1, 2 y
55 8. En el día 13, los ratones se anestesian con isofluorano en una cámara de inhalación y ambos pabellones auriculares de los animales experimentales y de control se miden con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición de la medida inicial. A continuación, los ratones se estimulan con la aplicación de 25 μ l de FITC al 0,5 % (en acetona/ftalato de dibutilo a 1:1) a la superficie dorsal de cada oreja. La hipersensibilidad por contacto se mide a las 24 h y 48 h más tarde como la diferencia entre la oreja derecha (estimulada) y la oreja
60 izquierda (sin estimular). Todas las medidas se realizan con un micrómetro de ingeniero. Los valores de fondo se determinan mediante la diferencia de la hinchazón en la oreja entre las orejas estimulada y sin estimular de ratones sin tratamiento previo. Se toman muestras de sangre completa y suero para análisis de FACS y/o ELISA antes de sacrificar los animales y las orejas se recogen para histología.

65

Método III (induce respuestas de Th1)

Los ratones BALB/c se pintan en la parte media del lomo rasurado con 25 ul de oxazolona al 2 % (en acetona/aceite de oliva a 4:1) usando una pipeta. En el día 7, los ratones se anestesian con isoflurano en una cámara de inhalación y ambos pabellones auriculares de los animales experimentales y de control se miden con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición de la medida inicial. A continuación, los ratones se estimulan con la aplicación de 8 ul de oxazolona a la superficie dorsal de cada oreja. La hipersensibilidad por contacto se midió a las 24 h y 48 h más tarde como la diferencia entre la oreja derecha (estimulada) y la oreja izquierda (sin estimular). Todas las medidas se realizan con un micrómetro de ingeniero. Los valores de fondo se determinan mediante la diferencia de la hinchazón en la oreja entre las orejas estimulada y sin estimular de ratones sin tratamiento previo. Se toman muestras de sangre completa y suero para análisis de FACS y/o ELISA antes de sacrificar los animales y las orejas se recogen para histología.

La implicación de IL-31 en el inicio y la perpetuación de la hipersensibilidad por contacto se somete a ensayo usando los anticuerpos que se describen en el presente documento frente a IL-31 en las fases del experimento tanto de sensibilización como de estimulación.

Ejemplo 920 Implicación de IL-31 en Dermatitis Atónica *In Vivo*Método I (Sensibilización de ratones NC/Nga)

Los ratones NC/Nga macho se adquirieron en CRL Japón. Los ratones tenían 4 semanas de edad a la llegada y se alojaron en condiciones de cuarentena de SPF durante 4 semanas para su aclimatación. Los ratones tenían aproximadamente 10-11 semanas de edad de comienzo de la sensibilización con el antígeno. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y los lomos se rasuraron con tijeras eléctricas. Aproximadamente 10 ug de extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) (Indoor Biotechnologies, pedido especial) se inyectaron por vía intradérmica en la parte baja del cuello 3 veces a la semana de 5 a 6 semanas hasta que los ratones desarrollaron lesiones cutáneas. Los animales de control recibieron 10 ul de inyecciones intradérmicas de PBS 3 veces a la semana. El extracto de Dp se preparó de acuerdo con el método de Matsuoka y colegas. Matsuoka H., *et al.*, *Allergy*: 58, 139 (2003). En resumen, 595 mg de extracto de cultivo agotado liofilizado de Dp se disolvieron en 12 ml de PBS estéril (Gibco). El Dp se mezcló en un tubo Falcon de 50 ml en un balancín de agitación durante 30 minutos. El extracto se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante se recogió tomaron alícuotas en tubos de criovial de 1 ml y se almacenaron a -20 °C.

Método II (Sensibilización de ratones DO11.10)

Los ratones transgénicos DO 11.10 se reprodujeron a partir de una colonia de las instalaciones y tenían entre 9,5 y 14 semanas de edad al inicio de la sensibilización con el antígeno. 24 horas después de la sensibilización epicutánea, los ratones se anestesiaron con isoflurano y todo el tronco (plomo y abdomen) de los ratones se rasuró con tijeras eléctricas. A continuación, los ratones se sujetaron con cinta con cinta quirúrgica de Elastina (Johnson y Johnson) en el lomo. Parches de gasa estéril de 1 cm² se humedecieron con cualquiera de 500 ug de ovoalbúmina (Calbiochem 32467) o PBS estéril (Gibco) y se adhirieron al lado posterior izquierdo de los ratones con Apósito Extra Fino DuoDerm (ConvaTec 187932). El bachiller apósito se cubrieron a continuación en una envoltura corporal de la cinta quirúrgica de Elastina de modo que los ratones no pudieran retirar ni destruir los parches. Los parches se llevaron durante 7 días y se retiraron. Se dejó que los ratones descansaran durante dos semanas antes de tener otra ronda de sensibilización epicutánea. Los ratones recibieron un total de tres sensibilizaciones durante una semana.

50 Resultados

El análisis inmunohistoquímica o de la expresión de IL-31RA en la piel con lesiones y sin lesiones de animales DO11.10 sensibilizados con NC/Nga y OVA sensibilizados con ácaros del polvo mostraba que IOL-31RA se expresa mediante queratinocitos epidérmicos en ratones, sin embargo, no se pueden encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión entre animales sensibilizados con antígeno con respecto a animales sensibilizados con PBS.

Ejemplo 1060 Inhibición del Picor mediante la Administración de anticuerpos de IL-31 de Rata anti-ratón

En otro estudio de ratón NC/Nga, los ratones NC/Nga macho (SLC, Tokio), con una edad de 4 semanas se expusieron a ratones NC/Nga que ya estaban presentando dermatitis leve a moderada. A las siete semanas, los ratones se dividieron en tres grupos y recibieron los siguientes tratamientos. Cada cinco días durante siete semanas, a los ratones en un grupo se les administraron inyecciones de IL-31 de rata-anti-ratón a 10 mg/kg; a un grupo se le administraron inyecciones de albúmina de sólo de ratón; y el tercer grupo no recibió tratamiento alguno. Los ratones

se evaluaron clínicamente dos veces a la semana para la gravedad de las lesiones cutáneas. De forma específica, la implicación de la piel (0 = sin implicación; 1 = espalda implicado; 2 = espalda y cara; 3 = espalda cara y orejas) y gravedad de las lesiones (0 = piel normal; 1 = estamos ahí seca; 2 = lesiones nodulares; 3 = lesiones sanguinolentas). Además, se evaluó el picor. El rascado del ratón usando los dedos de sus patas traseras se detectaba automáticamente y se evaluó de forma objetiva usando MicroAct (Neuro-science, Tokio, Japón). Un pequeño imán revestido con teflón se implantó por vía subcutánea en el lado dorsal de ambas patas traseras de los ratones bajo anestesia con Ketalar/Xilazina. Los ratones con imanes se colocaron en una cámara de observación rodeados por una bobina redonda. La corriente eléctrica inducida en la bobina por el movimiento de los imanes se amplificó y se registró. El programa de análisis usó los siguientes ajustes para registrar sucesos de picor: Umbral (V) 0,1; Hueco del Suceso (seg) 0,2; Frec Máx (HZ) 20,0; Frec Mín (Hz) 2,0; y Duración Mín (seg) 1,5. Nota: en el modelo de ratón NC/, el comportamiento de rascado de larga duración (> 1,5 seg), pero no el de corta duración (0.3-1,5 seg) se relacionan con la sensación de picor específica de dermatitis en ratones. Los puntos finales primarios globales que se midieron fueron picor, dermatitis, y peso corporal.

15 Resultados:

Tomado durante todo el periodo, el tratamiento con el anticuerpo IL-31 de rata-anti-ratón no satisfacía los puntos finales primarios. Sin embargo, el análisis tradicional revelaba una reducción significativa del picor con el tratamiento con anticuerpo anti-IL-31 en el intervalo de tiempo de 22-43 días. En este periodo de tiempo, al igual que para todo el periodo de tiempo, el tratamiento con anticuerpos anti-IL-31 no influía en el desarrollo de lesiones similares a las de la dermatitis atópica y no normalizaban el aumento de peso de animales enfermos, quizá debido a un retraso del inicio de las manifestaciones clínicas o mediante neutralización de auto-anticuerpos al final del tratamiento. En este experimento, el comportamiento de rascado, pero no de dermatitis, estaba aumentado entre la mayoría de los animales en el momento en el que comenzó el tratamiento con el anticuerpo.

25 Ejemplo 11

DTH de Implicación de IL-31 *In Vivo*

30 Métodos

Para generar una respuesta a DTH, los ratones se sensibilizaron al antígeno en el día 0 mediante inmunización subcutánea en la base de la cola con 100 ug de Ovoalbúmina (OVA) en adyuvante de Freund completo (CFA, 50-100 ul de volumen total). Una semana más tarde, los ratones anestesiaron con isoflurano en una cámara de inhalación y ambos pabellones auriculares de los animales experimentales y de control se midieron con un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo) para obtener una medición de la medida inicial. Los ratones se estimularon por vía intradérmica con 10 ug de OVA en PBS en un volumen total de 10 ul en el pabellón auricular izquierdo, justo por debajo de la piel sin alcanzar ninguna vena. Como un control, los ratones también recibieron una inyección de 10 ul de PBS en el pabellón auricular derecho. En algunos casos, a un grupo de control separado al que se le proporcionó una inyección i.d. de OVA en la oreja también se puede tratar con corticosteroides tópicos como un control positivo para inhibir la reacción. A las 24 y 48 h después de la estimulación, los ratones se anestesiaron y se midió el grosor de la oreja. Los resultados se expresaron como: hinchazón específica de la oreja = (medida de 24 h - medida de 0 h) para la oreja experimental - (medida de 24 h - medida de 0 h) para la oreja de control negativo. La inflamación dura, la evidencia de DTH, se puede detectar a las 18 horas después de inyección de antígeno de sensibilización y es máxima a las 24-48 horas. El lapso en el inicio de la inflamación dura palpable es la razón para llamar a la respuesta "tipo retardado".

Resultados

50 Los ratones transgénicos de IL-31 se sometieron a ensayo para DTH, sin embargo, debido a un aumento del grosor de la oreja en animales transgénicos de IL-31 sin estimular, no se pudo determinar una diferencia estadísticamente significativa en DTH entre animales IL-31 Tg en comparación con controles de tipo silvestre. También se sometieron a ensayo los animales con supresión genómica para receptor de IL-31 en una respuesta a DTH y no se pudo observar ninguna diferencia significativa en la respuesta a DTH entre animales con supresión genómica de receptor y de tipo silvestre.

Ejemplo 12

Implicación de IL-31 en la Inducción de la Respuesta al Picor

60 Método I (Tratamiento con capsaicina de ratones tratados con IL-31)

65 Los animales BALB/c de diez semanas de edad (CRL) se anestesiaron y se inyectaron con un agente anestésico de larga duración, clorhidrato de bupranorfina, por vía subcutánea a 0,1 mg/kg antes de la inyección de 0,25 ml de 4 mg/ml de solución de capsaicina en etanol al 10 % + Tween-80 al 10 % en solución salina por vía subcutánea en la parte baja del cuello. Los animales se mantuvieron anestesiados durante al menos 30 min después del tratamiento

con neurotoxina. Cuarenta y ocho horas más tarde, se implantaron bombas osmóticas de 14 días por vía subcutánea para una administración continua de 20 ug/día de IL-31 durante 14 días. Los ratones se controlaron diariamente durante 6 días para alopecia y prurito usando los siguientes criterios: 0 = sin picor, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del revestimiento en zonas pequeñas, picor observado, 2 = pérdida de pelo menor (pequeños parches), picor, 3 = pérdida de pelo moderada, picor, y 4 = pérdida de pelo grave, picor excesivo.

Los resultados demostraban que aunque los ratones no tratados con capsaicina presentaban una puntuación media de picor/pérdida del pelo de 2,625 después de tres días de administración de IL-31, los ratones tratados con capsaicina presentaban una puntuación significativamente menor de 1. Por lo tanto, los ratones tratados con capsaicina antes de la administración de IL-31 mostraban tanto un retraso de la incidencia del picor y la pérdida de pelo como una puntuación más baja en la intensidad del picor y la pérdida de pelo durante los seis días del experimento. Estos datos sugieren que IL-31 induce un cierto componente neuronal que contribuye a la alopecia y prurito inducidos por IL-31. Por lo tanto, la neutralización de IL-31 puede disminuir la incidencia y la intensidad del picor, y por lo tanto la dermatitis, en pacientes que padecen trastornos cutáneos que implican picor.

Método II

Los ratones que son homocigotos nulos para el gen Tac1 no expresan sustancia P detectable ni neuroquinina A. Estos ratones presentan respuestas al dolor nociceptivo significativamente reducidas a estímulos de moderados intensos y por lo tanto son una herramienta útil para el estudio de la contribución de los péptidos de taquiquinina al procesamiento del dolor/picor y patologías inflamatorias. A los ratones con supresión genómica de Tac1, de doce semanas de edad se les implantaron bombas osmóticas de 14 días que administraban 1 ug/día de proteína IL-31 y se observaban diariamente para alopecia y prurito usando los siguientes criterios: 0 = sin picor, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del revestimiento en zonas pequeñas, picor observado, 2 = pérdida de pelo menor (pequeños parches), picor, 3 = pérdida de pelo moderada, picor, y 4 = pérdida de pelo grave, picor excesivo.

Los resultados de este estudio muestran que los ratones con déficit de Tac1 eran menos susceptibles al picor/pérdida de pelo inducidos por IL-31 en comparación con los ratones de control de tipo silvestre. Aunque un 100 % (10/10) de los ratones silvestres habían desarrollado evidencias de picor y pérdida de pelo hacia el día 6 del tratamiento con IL-31, solamente un 33,3 % (2/6) de ratones con déficit de Tac1 seguían mostrando signos de picor y pérdida de pelo en el mismo punto temporal. Estos datos muestran que la IL-31 induce un componente neuronal que contribuye al fenotipo de picor/pérdida de pelo en ratones tratados con IL-31 y la neutralización de IL-31 puede disminuir la incidencia y la intensidad de picor en el contexto de la dermatitis.

Método III (Administración de anticuerpo de neutralización de IL-31)

A ratones BALB/c hembra normales (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de edad se les implantaron por vía subcutánea bombas osmóticas de 14 días (Alzet, Nº 2002) que administraban 1 ug/día de mL-31. Los grupos de ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) 10 mg/kg de anticuerpo monoclonal IL-31 de rata anti-ratón (200 ug/ratón) dos veces a la semana comenzando 1 semana antes de la administración de IL-31. Los grupos de control de los ratones recibieron inyecciones i.p. de vehículo (PBS/BSA al 0,1 %) con los programas de dosificación idénticos. Los ratones se puntuaron diariamente para alopecia y prurito usando los siguientes criterios: 0 = sin picor, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del revestimiento en zonas pequeñas, picor observado, 2 = pérdida de pelo menor (pequeños parches), picor, 3 = pérdida de pelo moderada, picor, y 4 = pérdida de pelo grave, picor excesivo.

En todos los experimentos, los ratones tratados con mAb de rata anti-mL-31 presentaban un retraso en el inicio de los síntomas de aproximadamente 5 a 7 días y una puntuación global menor para alopecia y prurito. Todos los grupos de ratones tratados con mAb (independientemente de la frecuencia o concentración de la dosis) desarrollaron alopecia y prurito del mismo modo que los ratones de control hacia el día 13 del estudio. Estos datos sugieren que la neutralización de IL-31 puede retrasar el inicio de la respuesta a picores/pérdida de pelo inducida por IL-31.

Ejemplo 13

Caracterización de anticuerpos Monoclonales IL-31 de Ratón-anti-humano

Se aisló un panel de 21 hibridomas clonales que producían anticuerpos monoclonales (mAb) específicos para interleuquina 31 (IL31) humana (recombinante). Se aislaron diez hibridomas que producen mAb de fuerte neutralización. Estos se asignaron a dos subgrupos basados en estudios de unión competitiva. Se aislaron once hibridomas que producían mAb de neutralización débil. Estos se asignaron a 4 grupos adicionales basándose en estudios de unión competitiva. Un mAb funcionaba bien para Transferencia de Western, y también trabajaba bien para inmunohistoquímica. Se identificaron tres mAb adecuados para uso como antagonistas competitivos. También se identificaron anticuerpos monoclonales adecuados para inmunoensayos de sándwich.

A. Clasificación de epítopo con Biacore

Materiales: El anticuerpo de captura era IgG -Fc y de Cabra-anti- ratón específico (Jackson N° 115-005-071); el anticuerpo de bloqueo era fragmento de Fc de IgG policlonal (Jackson Labs.); el antígeno: rIL31 Producido en BHK con una etiqueta de afinidad de CEE; Biacore 1000; chip activado con NHS de Biacore CM5 (Biacore, PN BR-1000-14).

Método: Se realizaron estudios en un sistema Biacore1000™. Para métodos de realización de programación se usó BIAlogue v. 1.2. El anticuerpo de Fc de cabra-anti-ratón se inmovilizó de forma covalente con un chip de Biacore CM5 mediante restos de lisina para formar la superficie de unión activa para el estudio. Cada uno de los 21 sobrenadantes de medio acondicionado clonal de mAb de razón anti-hull31 se inyectó primero en la superficie de Fc de cabra-anti-ratón, de modo que el mAb primario a someter a ensayo se podría unir a la superficie del anticuerpo anti-ratón en una orientación favorable. A continuación, los sitios de unión restantes se bloquearon con inyección de un fragmento de Fc de IgG policlonal irrelevante. El antígeno (rIL31) se inyectó a continuación y se capturó en la superficie del anticuerpo primario. Esto fue seguido de otra inyección de uno de los 21 sobrenadantes de medio acondicionado clonal de mAb de ratón anti-hull31 para someter a ensayo de la unión del anticuerpo secundario. Si el mAb primario y secundario competían por el mismo sitio de unión en el antígeno, el segundo mAb no se unía. Si los dos mAb no competían por el mismo sitio de unión en el antígeno, el segundo mAb se unía.

Cada sobrenadante se sometió a ensayo como el mAb primario en combinación con todo el conjunto de mAb. Se realizaron ciclos de control para demostrar la falta de respuesta del mAb secundario en ausencia de mAb primario o antígeno. Cada mAb sometido al ensayo frente a sí mismo se usó como el control negativo para establecer el nivel de señal de fondo. Los datos se recogieron usando el software de BioEvaluation 3.2 RCI, a continuación se cargaron en Excel™ para procesamiento de datos. Entre cada ciclo de ensayo de un par de anticuerpo monoclonal, la superficie de Fc de cabra-anti-ratón se degeneró con lavados de 2 x 30 segundos con HCl 50 mM.

Los mAb de neutralización fuerte (10) y los mAb de neutralización débil (11) se estudiaron en dos paneles separados, con la excepción de que cuando se estudiaron los mAb de neutralización débil, el mAb del hibridoma 292.64.6 se incluyó como un elemento representativo de los mAb de neutralización fuerte. Además, después de la revisión de las medidas de afinidad relativa y datos de neutralización en el contexto de los grupos de epítopo para los primeros dos paneles de clasificación, se realizó un tercer panel de clasificación en 8 mAb "seleccionados" que incluían los mAb de neutralización tanto fuerte como débil.

Resultados: Se completaron tres paneles de ensayo de emparejamientos de anticuerpo monoclonal para análisis de los mAb de neutralización tanto fuerte como débil. El primer panel sometió a ensayo todos los mAb de neutralización fuerte entre sí y el segundo panel sometió a ensayar todos los mAb de neutralización débil (y un mAb de neutralización fuerte representativo del hibridoma 292.64.6) entre sí. Un tercer panel se completó para evaluar de forma explícita el emparejamiento de un subconjunto de mAb de neutralización tanto fuerte como débil seleccionado para evaluación adicional.

Además de variaciones en la respuesta absoluta (RU) medida para diferentes pares de mAb, varios de los pares de mAb se comportaban de forma diferente cuando la orientación de los padres cambiaba (es decir, un mAb del par se usaba como un mAb primario con respecto a secundario). Tal comportamiento se observa frecuentemente y por lo general se atribuye a los mAb afectados que tienen epítopos superpuestos.

Se obtuvo un total de cuatro grupos distintos a partir del análisis de los primeros paneles completados. Para el primer panel, todos los anticuerpos de neutralización fuerte se agruparon en conjunto para definir un solo grupo (grupo 1: 292.12.3, 292.39.5, 292.51.5, 292.63.5, 292.64.6, 292.72.3, 292.84.1, 292.105.4, 292.109.4, 292.118.6). En el segundo panel, los anticuerpos de neutralización débil se agruparon en 3 grupos principales adicionales (grupo 2: 294.35.2, 294.146.5, 292.152.4, 292.152.4, 294.154.5; grupo 3: 294.35.3, 291.78.4, 294.158.5, 294.155.6, 294.163.2; grupo 4: 294.144.3) que eran distintos de un solo representativo del grupo N° 1 (292.64.6). Además, muchos de los emparejamientos de mAb evaluados en el panel 2 demostraban una clara asimetría de la respuesta dependiendo de la orientación en la que se sometían a ensayo los mAb, lo que indica una cierta superposición en los sitios de unión. Dos mAb del grupo 3, 294.35.3 y 291.78.4, presentaban evidencia de competición con los mAb en el grupo 2 cuando se sometían a ensayo como el mAb secundario. Además, en el panel 2, el anticuerpo 292.64.6 (grupo 1) de neutralización fuerte presentaba competición con los mAb en el grupo 3 cuando se sometían a ensayo como el anticuerpo primario.

Después de la finalización de los dos paneles de clasificación inicial, un grupo de los mAb de la neutralización más fuerte y los mAb de neutralización débil de afinidad más elevada se seleccionaron para evaluación adicional y se sometieron ensayo entre sí en el panel 3. Los resultados para el tercer panel eran totalmente coherentes con las realizaciones anteriores que mostraban que los anticuerpos de neutralización fuerte se agrupaban en conjunto y los anticuerpos de neutralización débil se separaban en los múltiples grupos establecidos. Además, el tercer panel demostraba una superposición parcial en la unión de dos mAb del grupo 2 (294.35.2 y 292.154.4) con un subconjunto de mAb asignados al grupo 1 (292.12.3, 292.72.3, 292.84). Esto conducirá la asignación de los subgrupos 1A y 1B dentro del grupo 1. En el panel 3, los mAb del hibridoma 292.163.2 (grupo 3) y 292.144.3 (grupo

4) se clasificaron de forma individual.

B. Clasificación de Epitopos en Placa de Microtitulación (ELISA Competitivo Sin Etiqueta)

5 **Materiales:** El anticuerpo de captura era IgG de cabra-anti-ratón (específico para Fc γ) Jackson N° 115-005-071; el anticuerpo del bloqueo era IgG1 de ratón, (ZymoGenetics); para este estudio se usaron sobrenadantes de medios acondicionados de los hibridomas; el antígeno era rIL31 Producido en BHK con una etiqueta de afinidad de CEE biotinilada usando el equipo a Sulfo-NHS-Biotina (Pierce, Rockford, IL); placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, NY); ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %); estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) ;
10 sustrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)

Método: Este método es similar al ELISA competitivo sin etiqueta (LFC-ELISA) que se describe en Nagata *et al* (2004). Este método para clasificación de epítipo usaba rIL31 biotinilado. Las placas de microtitulación se revistieron a 100 μ l/pocillo con 1 μ g/ml de un anticuerpo específico para Fc- γ de IgG de cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch N° 115-005-071) diluido en ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %). Después de la unión de este anticuerpo de revestimiento durante 3 horas a temperatura ambiente, cada medio acondicionado que contenía mAb se diluyó en ELISA B para producir una concentración aproximada de mAb de 0,5 μ g/ml y se permitió que se uniera a las placas revestidas con IgG de cabra anti-ratón durante una noche a 4 °C (mAb N° 1). En paralelo, un segundo conjunto de medios acondicionados (mAb N° 2) se diluyeron en tubos de ensayo de poliestireno hasta aproximadamente 0,5 μ g/ml de mAb en ELISA B, mezclado con 50 ng/ml de antígeno de rIL31 biotinilado, y se incubó durante una noche a 4 °C. Después de la incubación de mAb N° 1 con un anticuerpo de revestimiento, las placas se bloquearon con un anticuerpo no relacionado para saturar los sitios de unión sin ocupar en la placa. Las mezclas de mAb N° 2-biotina-rIL31 se añadieron a la placa y se permitió que se unieran. Como un control para (no competición) en el ensayo, se añadieron 50 ng/ml de rIL31 biotinilado directamente (sin incubación previa con mAb N° 2) a los pocillos que contenían el mAb N° 1 inmovilizado. Después de incubación con el complejo de IL31-mAb N° 2 biotinilado, se añadió estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) a la placa a 0,5 μ g/ml. Las placas se desarrollaron con sustrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), y la absorbancia de los pocillos individuales a 450 nm se midió como lector de placas (SpectraMax340 de Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Si el mAb N° 1 reconocía un epítipo diferente de mAb N° 2, el complejo de biotina-rIL31-mAb N° 2 unido a la placa daba como resultado una lectura de absorbancia elevada. Si el mAb N° 1 reconocía el mismo epítipo que mAb N° 2, el complejo de biotina-rIL31-Mab N° 2 no se unía a la placa dando como resultado una lectura de Absorbancia baja.

Resultados: El panel completo de los 21 mAb se sometió a ensayo frente a sí mismos de forma simultánea en una serie de seis placas de microtitulación de 96 pocillos. Los valores de absorbancia a 450 nm (A450nm) se registraron para cada combinación y orientación y se recopilaron. En todas las clases, se obtuvieron valores bajos de Absorbancia para las auto-auto combinaciones. Además del auto-auto control, un control positivo de 50 ng/ml de rIL31-biotina (sin mAb N° 2 de competición) se sometió al ensayo usando cada mAb primario en cada placa. Se obtuvieron dos muestras de control positivo para cada mAb primario, y los valores de las muestras por duplicado eran similares. Los valores de absorbancia obtenidos a partir de los pocillos del control positivo (sin mAb N° 2) para 9 de los 11 mAb de neutralización débil (de los grupos 2, 3 o 4) eran inferiores que los valores de absorbancia medidos para las muestras de control para el resto de los mAb. Supuestamente esto se debía a la menor afinidad (CE₅₀ más elevada) para esos mAb. Para facilitar la interpretación de los resultados, los valores de absorbancia se normalizaron de modo que a la absorbancia máxima medida para cualquier combinación de mAb a través de una fila (mAb de captura (mAb N° 1) mantenido constante) se le asignó un valor de un 100 %. Los valores normalizados entraron en dos grupos distintos: un grupo grande de valores entró por debajo de un valor de un 32 % coherente con la competición, y un segundo grupo grande de valores entró por encima de un 32 % coherente con una falta de competición. El valor del umbral de un 32 % se usó para asignar cada combinación y orientación de los mAb a una de dos categorías separadas (no competición y competición). Usando los datos clasificados, la clasificación se realizó de forma automática basándose en un algoritmo de agrupamiento jerárquico. Como se observó durante los experimentos de clasificación usando el Biacore, algunos pares de mAb se clasificaron de forma diferente dependiendo del mAb usado como el mAb primario. Se usó un nivel de rigurosidad elevado, que requería competición en ambas orientaciones, para asignar los mAb a grupos primarios. Posteriormente se usó un criterio menos riguroso, que requería competición solamente en una orientación, para ayudar en la asignación de los mAb a subgrupos basándose en diferencias de comportamiento menores. Los datos normalizados se agruparon de acuerdo con las 5 asignaciones de grupo primario basándose en los criterios de rigurosidad elevados. Además, las combinaciones y orientaciones de los mAb se codifican con color (blanco para competición y oscuro para no competición) para ayudar en la visualización de las interacciones que conducían a la asignación de los mAb a subgrupo.

60 Los resultados de la clasificación con ELISA competitivo son coherentes con las asignaciones de grupo basándose en los resultados de los estudios usando el Biacore. Usando los criterios de clasificación rigurosa, se definieron los siguientes grupos:

65 Grupo N° 1 (que contiene todos los mAb de fuerte neutralización): 292.72.3, 292.64.6, 292.63.5, 292.51.5, 292.39.5, 292.12.3, 292.118.6, 292.109.4, 292.105.4, 292.84.1
Grupo N° 2: 294.35.2, 294.154.5, 294.146.5, 292.154.4, 292.152.4

Grupo N° 3: 294.35.3, 294.163.2, 294.158.5, 294.155.6

Grupo N° 4: 294.144.3

Grupo N° 5: 291.78.4

5 Centrándose en el grupo N° 1, los mAb de 3 de los hibridomas en el grupo N° 1 (292.72.3, 292.12.3, 292.84.1) demostraban competición con 3 de los mAb del grupo N° 2 cuando se usaban como el mAb secundario (mAb N° 2). Basándose en este comportamiento, el grupo 1 se dividió en dos subgrupos; N° 1A y N° 1B, con el grupo N° 1B conteniendo los mAb que compiten con los del mAb grupo 2 por la unión. El grupo N° 1A contiene 292.64.6, 292.63.5, 292.51.5, 292.39.5, 292.118.6, 292.109.4, 292.105.4. El grupo N° 1B contiene 292.72.3, 292.12.3, y 292.84.1.

15 Centrándose en el grupo N° 2, son evidentes tres interacciones distintas que se usaron para dividir el grupo N° 2 en 3 subgrupos. El grupo N° 2A contiene mAb del hibridoma 294.146.5, que compite con todos los mAb de ambos grupos N° 1 y N° 2. El grupo N° 2B contiene los mAb de los hibridomas 294.35.2 y 294.154.5, que compiten con los mAb (secundarios) del grupo N° 1. El grupo N° 2C contiene los mAb de los hibridomas 292.154.4 y 292.152.4, que compiten con el mAb del grupo N° 4 cuando éste se usa como el mAb secundario.

20 Centrándose en los grupos N° 3, N° 4, y N° 5: Los mAb en el grupo N° 3 (de los hibridomas 294.35.3, 294.163.2.1, y 294.155.6) compiten con los mAb de ambos grupos N° 4 y N° 5 cuando se usan como mAb secundarios. Los mAb en los grupos N° 4 (del hibridoma 294.144.3.5) y N° 5 se diferencian principalmente por su interacción con los mAb en el subgrupo N° 2C (y las propiedades de unión únicas del mAb del hibridoma 294.144.3 en transferencias de Western).

25 Cuando el panel completo de los 21 mAb se sometió a ensayo de forma simultánea usando el formato de LFC-ELISA, el grupo 1 y los subgrupos N° 1A y N° 1B se identificaron claramente. La superposición parcial de los grupos N° 2 y N° 3 también se identificó cuando el panel completo de los mAb se sometía a ensayo de forma simultánea, y el grupo N° 2 se dividió en 3 subgrupos. Una desviación menor de las asignaciones del grupo basándose en datos de Biacore era la asignación de los mAb de los hibridomas 291.78.4 y 294.144.3 a dos grupos distintos cuando se usaban criterios estrictos con los datos de LFC-ELISA. Basándose en los estudios de Biacore, el mAb del hibridoma 291.78.4 se había asignado al grupo N° 3.

C. Medida de afinidad basada en placa

35 Materiales: El anticuerpo policlonal de captura era IgG de cabra-anti-ratón (específico para Fc γ) (Jackson ImmunoResearch West Grove, Pensilvania N° 115-005-071); del anticuerpo policlonal de bloqueo era IgG de ratón anti-humana, (Jackson ImmunoResearch, N° 209-005-082); para este estudio se usaron sobrenadante es de medios acondicionados a partir de los hibridomas; el antígeno era rIL31 Producido en BHK con una etiqueta de afinidad de CEE biotinilada usando el kit de a Sulfo-NHS-Biotina (Pierce, Rockford, IL); placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, NY); ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %); estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL); sustrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD).

45 Método: Este método es similar al descrito por van Heyningen (1986). Las placas de microtitulación se revistieron a 100 μ l/pocillo con 1 μ g/ml de un anticuerpo específico de Fc- γ de IgG de cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch N° 115-005-071) diluido en ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %). Después de la unión de este anticuerpo de revestimiento durante 3 horas a temperatura ambiente, cada sobrenadante de anticuerpo monoclonal purificado se diluyó en ELISA B para producir una concentración aproximada de mAb de 1 μ g/ml y se permitió que se uniera a la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones en serie de antígeno de rIL31 biotinilado a partir de 500 ng/ml a 0 ng/ml en ELISA B y se añadieron a los pocillos. Después de incubación con el antígeno biotinilado, se añadió estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) a 0,5 μ g/ml a la placa. Las placas se desarrollaron con sustrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD), y la absorbancia de los pocillos individuales a 450 nm se midió con un lector de placas (Molecular Devices SpectraMax340, Sunnyvale, CA). Se hizo un promedio de los puntos duplicados y los datos se analizaron con un ajuste de cuatro parámetros. El valor "C" del ajuste de 4 parámetros se indica como la CE_{50} aparente (ng/ml) y es la concentración de biotina-rIL31 que produce una respuesta media máxima en el ensayo.

55 Resultados: Se obtuvieron en ajustes de cuatro parámetros a partir de las curvas experimentales para los 21 de los mAb. La concentración de biotina-rIL31 que produce la respuesta media máxima (CE_{50}) en el ensayo variaba de 3,3 ng/ml a 236 ng/ml, con los 10 de los mAb de fuerte neutralización presentando valores de CE_{50} bajos y comparables (3,3-4,4 ng/ml).

D. Transferencia de Western

65 Materiales: El antígeno era rIL31 Producido en BHK con una etiqueta de afinidad de CEE; geles de NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA); tampón de muestra sin reducción (Invitrogen, Carlsbad, CA); los patrones de peso molecular eran SeeBlue (Invitrogen); tampón de realización MES 1x (Invitrogen); tampón de Western A (Tris 50 mM a pH 7.4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Igepal al 0,05 %, gelatina al 0,25 %); membranas de nitrocelulosa de

0,2 μm (Invitrogen); IgG-HRP de oveja anti-ratón (Amersham, Piscataway, NJ); pAb de conejo purificado por afinidad específico para rIL31 (ZymoGenetics); Ig-HRP de burro anti-conejo (Amersham); Reactivo quimioluminiscente Lumi-Light Plus (Roche, Mannheim, Alemania); Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer).

5 Método: En este estudio se examinó la capacidad de los mAb para detectar rIL31 desnaturalizado y desnaturalizado/reducido en una transferencia de Western. El antígeno rIL31 se mezcló con cualquiera de tampón de muestra de reducción o de no reducción, calentado a 70 °C durante 1 min y a continuación cargado a 100 ng/calle en geles de NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los patrones de peso molecular eran SeeBlue (Invitrogen), y la electroforesis se realizó en tampón de realización MES 1X (Invitrogen). Las bandas de proteínas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (Invitrogen) y se bloquearon durante una noche en leche seca sin grasa al 2,5 % en tampón de Western A (Tris 50 mM a pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Igepal al 0,05 %, gelatina al 0,25 %). Las membranas de nitrocelulosa se sondearon con cada anticuerpo monoclonal a una concentración aproximada de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mAb. Ta continuación, se sondearon las transferencias con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP de oveja anti-ratón; Amersham, Piscataway, NJ). Como un control positivo, se sondeó una transferencia de Western separada con 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo policlonal de conejo específico para IL-31 (ZymoGenetics), y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Ig-HRP de burro anti-conejo; Amersham). Las bandas en las transferencias de Western se detectaron con Reactivo Lumi-Light Plus (Roche, Mannheim, Alemania) y la quimioluminiscencia se registró en un Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer).

10 Resultados: El análisis de transferencia de Western de los mAb anti IL31 demostraba que los mAb de solamente tres de los 21 hibridomas detectaban el antígeno de rIL31 desnaturalizado. La señal más fuerte se obtuvo a partir del mAb producido por el hibridoma 294.144.3. Este mAb también detectó el rIL31 reducido/desnaturalizado más fuertemente que el rIL31 no reducido/desnaturalizado. La intensidad de la señal observada con este mAb era similar a la obtenida con el control de anticuerpo policlonal. Es de destacar que el mAb del hibridoma 294.144.3 pertenece a un grupo separado de los otros mAb evaluados. Algunos anticuerpos monoclonales de otros dos hibridomas (292.84.1 y 292.64.6) detectaban el rIL31 no reducido/desnaturalizado muy débilmente pero no detectaban el rIL31 reducido/desnaturalizado. Este señal débil no se reproducía en las transferencias escaneadas. Ambos de estos mAb son anticuerpos de neutralización del grupo N° 1.

30 Ejemplo 14

Afinidad de Unión Relativa de los Anticuerpos Monoclonales de Rata Anti-Ratón para el Ligando de IL-31

35 La afinidad de unión relativa de cuatro MAb de Rata-anti-Ms-IL-31-ligando con respecto al ligando de IL-31 se determinó como sigue a continuación. El Clon 271.26.6.6.1, el Clon 271.33.3.2.1, el Clon 271.33.1.2.2, y el Clon 271.39.4.6.5 se sometieron a ensayo. El Anticuerpo específico para IgG-Fc y de Cabra-anti-Rata (Jackson) se inmovilizó en un chip de CM5 Biacore. Después de un ensayo preliminar, el ensayo se optimizó adicionalmente para unir cada MAb sobre la superficie de captura anti-Rata y a continuación se inyectó a una serie de concentración de ligando de IL-31 a través del MAb para ver la asociación y la disociación. Después de cada realización, la superficie se regeneró de nuevo para el Anticuerpo anti-Rata inmovilizado con 2 inyecciones de HCl 30 mM. Se generaron datos para cada MAb y se usó software de evaluación para definir los valores cinéticos relativos.

45 Los datos cinéticos relativos generados mediante evaluación de las curvas de unión de MAb-antígeno se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Clon	271.26.6.6.1	271.33.3.2.1	271.33.1.2.2	271.39.4.6.5
ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	5,61E+05	1,43E+05	8,19E+05	8,94E+05
kd (s ⁻¹)	3,6E-04	5,46E-04	4,21E-04	6,21E-04
KD (M)	6,42E-10	3,81E-9	4,73E-10	6,94E-10
Chi2	0,101	0,341	0,0917	1,92

50 Ejemplo 15

Reducción de TARC y MDC como respuesta al anticuerpo anti-IL-31 en modelos de ratón con AD

Método I

55 Ratones NC/Nga hembra de seis semanas de edad (CRL Japón) se sensibilizaron por vía intradérmica con 50 μg de extracto de ácaros del polvo (*D. pteronyssinus*, Indoor Biotechnologies) tres veces a la semana en la espalda y se puntuaron para lesiones similares a las de la AD. Después de 5 semanas de sensibilización, los ratones se

sacrificaron y las orejas derechas se extirparon y se colocaron en un solo pocillo de un disco de cultivo de 48 pocillos (Corning) complementado con RPMI + FBS al 2 % (GIBCO Invitrogen). Las placas se colocaron en incubadoras con humedad controlada con CO₂ al 5 %. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y se congelaron a -20 °C hasta análisis adicional.

5 Método II

10 Ratones NC/Nga hembra de doce semanas de edad (CRL Japón) se sensibilizaron por vía intradérmica con 10 µg de SEB (Toxin Technology) en la oreja y en la espalda tres veces a la semana. Los ratones se puntuaron para lesiones similares a las de la AD. Después de 5 semanas de sensibilización, los ratones se sacrificaron y se realizaron perforaciones de biopsia de 6 mm a partir de la oreja inyectada de cada ratón y se colocaron en un solo pocillo de un disco de cultivo de 48 pocillos complementado con RPMI + FBS al 2 %. Las placas se colocaron en incubadoras con humedad controlada con CO₂ al 5 %. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y se congelaron a -20 °C hasta análisis adicional.

15 Los grupos de ratones en ambos estudios se trataron con cualquiera de un anticuerpo monoclonal de IL-31 de rata anti-ratón a 10 mg/kg o vehículo, por vía intraperitoneal dos veces cada semana comenzando después de 1 a 2 semanas de sensibilización.

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

25 Las concentraciones de TARC y MDC eran menores en los sobrenadantes de oreja de los ratones tratados con anti-IL-31 en comparación con los ratones de control en ambos estudios, sin embargo, estos resultados no eran estadísticamente significativos cuando se analizaron con ANOVA, debido probablemente al pequeño tamaño de la muestra. Cuando los datos de ambos experimentos se combinan y se analizan, existe una diferencia estadísticamente significativa entre grupos tratados.

30 Ejemplo 16

Administración de anticuerpo de neutralización de IL-31

35 A ratones BALB/c hembra normales (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de edad se les implantaron por vía subcutánea bombas osmóticas de 14 días (Alzet, Nº 2002) que administraban 1 µg/día de mIL-31. Los grupos de ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) 10 mg/kg de anticuerpo monoclonal IL-31 de rata anti-ratón (200 µg/ratón) dos veces a la semana comenzando 1 semana antes de la administración de IL-31. Los grupos de control de los ratones recibieron inyecciones i.p. de vehículo (PBS/BSA al 0,1 %) con los programas de dosificación idénticos. Los ratones se puntúan diariamente para alopecia y prurito usando los siguientes criterios: 0 = sin picor, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del revestimiento en zonas pequeñas, picor observado, 2 = pérdida de pelo menor (pequeños parches), picor, 3 = pérdida de pelo moderada, picor, y 4 = pérdida de pelo grave, picor excesivo.

45 En todos los experimentos, los ratones tratados con mAb de rata anti-mIL-31 presentaban un retraso en el inicio de los síntomas de aproximadamente 5 a 7 días y una puntuación global menor para alopecia y prurito. Todos los grupos de ratones tratados con mAb (independientemente de la frecuencia o concentración de la dosis) desarrollaron alopecia y prurito del mismo modo que los ratones de control hacia el día 13 del estudio. Estos datos sugieren que la neutralización de IL-31 puede retrasar el inicio de la respuesta a picores/pérdida de pelo inducida por IL-31.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES IL-31 Y MÉTODOS DE USO

55 <130> P31353EP-D1-PCT-MRM/PJG

<140> EP 06752420.7

<141> 08-05-2006

60 <150> 60/678.918

<151> 06-05-2005

<150> 60/696.251

<151> 01-07-2005
<150> 60/711.600
<151> 26-08-2005
5 <160> 7
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
10 <210> 1
<211> 904
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
15 <220>
<221> CDS
<222> (28)...(519)
20 <400> 1

ES 2 561 628 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 tcttccttc 539
Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
155 160

ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599
gccgtgattc ctttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctc catatgggct 659
agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg ctttaagtctt acttattata 779
ccctcgtgag ggtgggagggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
ttgtcaatgc tccttggggg agccctcgga atctatntaa taaattatat tgaatttttc 899
tcata 904

```

<210> 2

<211> 164

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 561 628 T3

```

Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys
 1          5          10          15
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          80
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          105          110
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          160
Gln Ala Thr Thr

```

<210> 3

<211> 755

5 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(489)

<400>3

ES 2 561 628 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

gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcbgg 589

cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649
tgtagggact ggaagtggca gctatatitta tttatttatg tactgagttt gttaacgctc 709
catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755

```

- <210> 4
- <211> 163
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 4

ES 2 561 628 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

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>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

10

ES 2 561 628 T3

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

ES 2 561 628 T3

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
 625 630 635 640
 Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser
 645 650 655
 Ser Cys Pro Thr Ser Ile
 660

<210>6
 <211> 979
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400>6

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
 180 185 190
 Pro His Val Thr Ala Phe Asn Leu Asn Ser Val Pro Phe Ile Arg Asn
 195 200 205
 Lys Gly Thr Asn Ile Tyr Cys Glu Ala Ser Gln Gly Asn Val Ser Glu
 210 215 220
 Gly Met Lys Gly Ile Val Leu Phe Val Ser Lys Val Leu Glu Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Phe Ser Cys Glu Thr Glu Asp Phe Lys Thr Leu His Cys Thr
 245 250 255
 Trp Asp Pro Gly Thr Asp Thr Ala Leu Gly Trp Ser Lys Gln Pro Ser
 260 265 270
 Gln Ser Tyr Thr Leu Phe Glu Ser Phe Ser Gly Glu Lys Lys Leu Cys
 275 280 285
 Thr His Lys Asn Trp Cys Asn Trp Gln Ile Thr Gln Asp Ser Gln Glu
 290 295 300
 Thr Tyr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Glu Asn Tyr Leu Arg Lys Arg Ser

ES 2 561 628 T3

305					310					315					320
Val	Asn	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Thr	His	Arg	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Pro
				325					330					335	
Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asn	Val	Asn	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Met	Thr
			340					345					350		
Trp	Lys	Val	His	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Phe	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Ile
		355					360					365			
Glu	Leu	His	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Met	Gln	Tyr	Asn	Val	Ser	Ile	Lys
	370					375					380				
Val	Asn	Gly	Glu	Tyr	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
385					390					395					400
Met	Ala	Arg	Val	Arg	Cys	Ala	Asp	Ala	Ser	His	Phe	Trp	Lys	Trp	Ser
				405					410					415	
Glu	Trp	Ser	Gly	Gln	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu
			420					425					430		
Ala	Pro	Asp	Val	Trp	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Thr
		435					440					445			
Val	Thr	Leu	Phe	Trp	Lys	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Gly	Lys
	450					455						460			
Ile	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser
465					470					475					480
Ser	Glu	Leu	His	Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Lys	Leu	Ile
				485					490					495	
Leu	Asp	Arg	Cys	Ser	Tyr	Gln	Ile	Cys	Val	Ile	Ala	Asn	Asn	Ser	Val
			500					505					510		
Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Ser	Val	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Asn
		515					520					525			
Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile	Ala	Gly	Thr	Glu	Gly	Gly	Phe	Ser
	530					535					540				
Leu	Ser	Trp	Lys	Pro	Gln	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Val	Val	Asp
545					550					555					560
Trp	Cys	Asp	His	Thr	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Asp	Phe	Gln	Trp	Lys	Asn
				565					570					575	
Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Val	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Phe	Arg
			580					585					590		
Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg
		595					600						605		
Ile	Ala	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Glu	Leu	Ala
	610					615					620				
Pro	Ser	Asp	Asn	Pro	His	Val	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	His	Ser
625					630					635					640
Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe
				645					650					655	
Ile	Gln	Gly	Tyr	His	Val	Tyr	Leu	Lys	Ser	Lys	Ala	Arg	Gln	Cys	His
			660					665					670		
Pro	Arg	Phe	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	Cys	Lys
		675					680					685			
Tyr	Lys	Ile	Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Val	Asp	Asn	Leu
	690					695						700			
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			

ES 2 561 628 T3

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

<210>7

<211>6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Etiqueta peptídica Glu-Glu

<400>7

Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-IL-31 de neutralización humanizado aislado, obtenido por humanización del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de Denominación PTA-6815 del Depósito de Patentes de la ATCC.
2. El anticuerpo monoclonal anti-IL-31 de neutralización humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en medicina.
- 10 3. El anticuerpo monoclonal anti-IL-31 de neutralización humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de dermatitis atópica, prurito o alopecia areata.
- 15 4. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo monoclonal anti-IL-31 de neutralización humanizado de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de control de expresión unida de forma operativa al polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
- 20 6. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 5, en donde la célula expresa el anticuerpo monoclonal anti-IL-31 de neutralización humanizado de acuerdo con la reivindicación 1.
7. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la célula es una célula eucariota.