

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 853**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008** **E 12161272 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2471817**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo humanizadas específicas para IL-31**

30 Prioridad:

**07.12.2007 US 12362 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2016**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (50.0%)**  
**1201 Eastlake Avenue East**  
**Seattle, Washington 98102, US y**  
**MERCK SERONO S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BONDENSGAARD, KENT y**  
**BECKMANN, ROLAND**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

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

**ES 2 570 853 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**

Moléculas de anticuerpo humanizadas específicas para IL-31

**Antecedentes de la invención**

5 Se ha descubierto que cuando se sobreexpresa en ratones la IL-31, una citocina recientemente identificada, da como resultado síntomas similares a la dermatitis. Véase, Dillon, y col., Nature Immunol. 5: 752-760, 2004. Estos síntomas se pueden aliviar mediante el uso de antagonistas que bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan la actividad de la IL-31, y que incluyen anticuerpos anti IL-31. Véase también, Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 10/352.554, presentada el 21 de enero de 2003 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003-0224487), ahora Patentes de Estados Unidos n.º de Serie 7.064.186, 7.425.325 y 10 7.459.293.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales ha proporcionado un vasto conjunto de productos terapéuticos así como de diagnóstico para su uso en la identificación y el tratamiento de enfermedades. Se han descrito varias moléculas recombinantes o biosintéticas que comprenden sitios de unión a antígeno de roedor. En particular, se han descrito moléculas que tienen sitios de unión a antígeno de roedor construidas de forma directa sobre anticuerpos de ser humano mediante el injerto del sitio de unión de roedor solamente, en lugar del dominio variable completo, en dominios de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de ser humano. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. (1988) Nature 332: 323-327 y Verhoeyen y col. (1988) Science 239: 1534-1536. Se han descrito en la Publicación de Patente del R.U. n.º GB 2.276.169, publicada en 21 de sep. de 1994, moléculas que tienen un sitio de unión a antígeno en las que por lo menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable se obtiene de un anticuerpo monoclonal murino y las partes restantes obtenidas de inmunoglobulina de la molécula, se obtienen de inmunoglobulina de ser humano. También se han descrito varios polipéptidos de sitio de unión a antígeno monocatenarios y moléculas Fv monocatenarias (sFv). Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.132.405 y 5.091.513, para Huston y col.; y la Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778 para Ladner y col.

25 Se han descrito anteriormente anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-31 de ser humano en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/430.066, presentada el 8 de mayo de 2006 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-02752960), que describe anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen a la IL-31 del ser humano y que pueden utilizarse para generar anticuerpos quiméricos. Sin embargo, los anticuerpos quiméricos pueden provocar inmunogenicidad y por esto son convenientes los anticuerpos de ratón anti IL-31 de ser humano humanizados. En general los anticuerpos humanizados tienen por lo menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos de ratón o, en algunos casos, sobre los quiméricos, para el uso en terapia del ser humano: (1) Debido a que la porción efectora es de ser humano, pueden interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario del ser humano (por ejemplo, destruir las células diana de forma más eficaz mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)); (2) El sistema inmunitario del ser humano no debería reconocer el armazón o región constante del anticuerpo humanizado como extraño, y por lo tanto la respuesta de anticuerpos frente a tal anticuerpo inyectado debería ser menor que frente a un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño; y (3) se ha notificado que los anticuerpos de ratón inyectados tienen una semivida en la circulación del ser humano mucho más corta que la semivida de los anticuerpos normales (D. Shaw y col., J. Immunol., 138, 4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados presumiblemente tendrán una semivida más semejante a la de los anticuerpos de ser humano de origen natural, permitiendo que se proporcionen dosis más pequeñas y menos frecuentes.

El documento WO 2006/122079 describe anticuerpos monoclonales de IL-31 y los procedimientos de utilización.

Por lo tanto, existe una necesidad de moléculas que proporcionen secuencias de aminoácidos de la región variable humanizada para los anticuerpos de ratón anti IL-31 de ser humano, para el tratamiento de la inflamación que media la IL-31.

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención concierne a un anticuerpo aislado (como se define en las reivindicaciones) que se une a la IL-31 de ser humano, que comprende: a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende CDR que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente; y b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende CDR que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7. En los anticuerpos de la invención: a) dicho dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4 que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13(FR2), 14 (FR3) y 15 (FR4) respectivamente; y b) dicho dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7 y FR8 que tienen la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 19 (FR7) y 20 (FR8), respectivamente.

En otro aspecto, la invención concierne a un anticuerpo aislado como se describe en las reivindicaciones, en el que el aminoácido en la posición 29 en la FR1 de la cadena pesada es leucina y el aminoácido en la posición 32 en la FR3 de la cadena pesada es fenilalanina. En otro aspecto la invención concierne a un anticuerpo aislado como se

describe en las reivindicaciones, en el que el aminoácido en la posición 8 en la FR3 de la cadena pesada es lisina y el aminoácido en la posición 15 en la FR7 de la cadena ligera es tirosina.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo aislado que se une a la IL-31 de ser humano, que comprende: a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende las CDR1 y CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y 3 respectivamente, y la CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de AIYPGDGDTRYSXaa1Xaa2FXaa3G (SEQ ID NO: 22), en la que Xaa1 es glutamina o prolina, Xaa2 es serina o lisina y Xaa3 es glutamina o lisina; comprendiendo dicho dominio variable de la cadena pesada humanizado las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4 que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de: las SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11 respectivamente, o las SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15 respectivamente, o las SEQ ID NO: 12, 13, 16 y 15 respectivamente; y a condición de que el aminoácido en la posición 29 en la FR1 sea leucina y el aminoácido en la posición 32 en la FR3 sea fenilalanina; b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende CDR que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, comprendiendo dicho dominio variable de la cadena ligera humanizado las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7 y FR8 que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 respectivamente, o por lo menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17, 18, 21 y 20 respectivamente. Dicha identidad puede ser por lo menos el 95 %, incluso más preferentemente por lo menos el 98 %, muy preferentemente por lo menos el 99 %. En otro aspecto, la invención concierne a un anticuerpo aislado como se describe en las reivindicaciones en el que el aminoácido en la posición 8 en la FR3 de la cadena pesada es lisina y el aminoácido en la posición 15 en la FR7 de la cadena ligera es tirosina. La memoria descriptiva describe un anticuerpo aislado como describe en el presente documento en el que: el aminoácido Xaa1 es glutamina, Xaa2 es lisina y Xaa3 es lisina; el aminoácido Xaa1 es prolina, Xaa2 es serina y Xaa3 es glutamina; o el aminoácido Xaa1 es glutamina, Xaa2 es lisina y Xaa3 es glutamina.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo aislado como se describe en el presente documento en el que las CDR del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 1, 4, 3 y respectivamente, las CDR del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 5, 6, y 7 respectivamente, las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11 respectivamente, y las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 respectivamente.

En otro aspecto de la invención concierne a un anticuerpo aislado como se describe en las reivindicaciones en el que las CDR del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente, las CDR del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 respectivamente, las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15 respectivamente, y las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 respectivamente.

La memoria descriptiva describe un anticuerpo aislado como se describe en el presente documento, en el que las CDR del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente, las CDR del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 respectivamente, las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 12, 13, 16 y 15 respectivamente, y las regiones marco conservadas del dominio variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 17, 18, 21 y 20 respectivamente.

Como se mostrará a partir de los Ejemplos y enseñanzas en el presente documento, la presencia de una leucina en la posición 29 en la FR1 y de una fenilalanina en la posición 32 en la FR3 de los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento, tiene un impacto positivo en términos de la afinidad y potencia de dichos anticuerpos. Por ejemplo, como se muestra en un ensayo Biacore, la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados que portan una leucina en la posición 29 en la FR1 y una fenilalanina en la posición 32 en la FR3 es mejor, cuando se compara con los anticuerpos humanizados que portan otros aminoácidos en estas posiciones (comparar por ejemplo los clones número 7, 10, 13 y 14 en la Tabla 2 del Ejemplo 3). También se han confirmado mediante otras dos pruebas biológicas el impacto positivo en términos de afinidad y potencia de estos aminoácidos en la posición 29 de la FR1 y 94 de la FR3 de la cadena pesada (véanse los Ejemplos 4 y 5).

En una realización de la presente invención, el anticuerpo desvelado en las reivindicaciones comprende un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina de ser humano  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ , o  $\epsilon$ . En una realización de la presente invención, el anticuerpo desvelado en las reivindicaciones comprenden un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de IgG1 de ser humano; un dominio constante de IgG2 de ser humano; un dominio constante de IgG3 de ser humano; un dominio constante de IgG4 de ser humano, un dominio constante de IgM de ser humano; un dominio constante de IgE de ser humano y un dominio constante de IgA de ser humano. En una realización, el dominio constante de IgG4 de ser humano es una forma mutada estable en solución, con poca o ninguna actividad de activación del complemento. En una realización, el dominio de la región constante de inmunoglobulina de la cadena pesada es un dominio constante de IgG4 de ser humano con una mutación Ser a Pro en la posición 241 (numeración de Kabat).

En una realización, el dominio de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina del ser humano  $\kappa$  o  $\lambda$ . Preferentemente, el dominio de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina es la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina de ser humano  $\kappa$ .

## 5 **Descripción detallada de la invención**

Antes de exponer la invención en detalle, puede ser útil para la comprensión de la misma definir los siguientes términos:

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de unión a antígeno, tales como F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos proteolíticos Fab, y fragmentos de la región variable monocatenarios (scFv). También se incluyen anticuerpos intactos o fragmentos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y similares, así como péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos. Los anticuerpos que no son de ser humano pueden humanizarse mediante el injerto de CDR que no son de ser humano sobre el armazón y las regiones constantes de ser humano, o incorporando los dominios variables que no son de ser humano completos (de forma opcional "camuflándolos" con una superficie similar a ser humano mediante el reemplazo de restos expuestos, en los que el resultado es un anticuerpo "revestido"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos que no son de ser humano dentro de los dominios del armazón de la región variable de ser humano para potenciar las características de unión adecuadas. A través de la humanización de anticuerpos se puede aumentar la semivida biológica y reducir el potencial de reacciones inmunitarias adversas después de la administración a seres humanos.

20 La expresión "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos cuyos genes de la cadena ligera y pesada se han construido, normalmente mediante ingeniería genética, a partir de los genes de la región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a especies distintas. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes de ser humano, tales como gamma 1 y gamma 3. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es, así, una proteína híbrida compuesta del dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo de ser humano, aunque se pueden utilizar otras especies de mamífero.

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

30 Un gen de la región variable en el extremo NH<sub>2</sub> (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH, codifican las "cadenas ligeras" (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) de inmunoglobulina de longitud completa. De manera similar, un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros anteriormente mencionados genes de la región constante (aproximadamente 330 aminoácidos) codifican las "cadenas pesadas" (aproximadamente 50 kd o 446 aminoácidos) de inmunoglobulina de longitud completa. Las cadenas pesadas se clasifican 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 ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase en general, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2<sup>a</sup> ed. Raven Press, N.Y., 1989), Cap. 7.

35 Una región de variable de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en 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 responsable de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los restos de aminoácidos de una "Región Determinante de Complementariedad" o "CDR" (es decir, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; (Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los restos de la "Región Marco Conservada" o "FR" son los restos del dominio variable que no son restos de la región hipervariable, como se define en el presente documento. Las secuencias de las regiones marco conservadas de cadenas ligeras o pesadas distintas están relativamente conservadas dentro de una especie. Por lo tanto, una "región marco conservada de ser humano" es una región marco conservada que es esencialmente idéntica (aproximadamente el 85 % o más, normalmente el 90-95 % o más) a la región marco conservada de una inmunoglobulina del ser humano de origen natural. La región marco conservada de un anticuerpo, que es las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirven para posicionar y alinear a los CDR. Los CDR son principalmente responsables 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 de ser humano y una o más CDR de una inmunoglobulina que no es de ser humano (normalmente una de ratón o de rata). La inmunoglobulina que no es de ser humano que proporciona las CDR se denomina la "donante" y la inmunoglobulina de ser humano que proporciona el armazón se denomina la "aceptora".

Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser esencialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina de ser humano, es decir, por lo menos aproximadamente el 85 %-90 %, preferentemente aproximadamente el 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son esencialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina de ser humano naturales. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una de cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico como se define anteriormente, por ejemplo, debido a que la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es de ser humano.

La expresión "anticuerpos recombinantes" significa anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos se ha variado a partir de la de un anticuerpo nativo. Debido a la importancia de las técnicas del ADN recombinante en la generación de anticuerpo, no se necesita estar confinado a las secuencias de los aminoácidos encontrados en los anticuerpos naturales; los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y varían desde el cambio de solo uno o unos pocos aminoácidos, al rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. En general, los cambios en la región constante se harán para mejorar o alternar características, tales como la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se harán para mejorar las características de unión a antígeno.

Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de otras formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos monocatenarios o Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbrido multivalentes o multiespecíficos (como se describe anteriormente, y en detalle en: Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y monocatenarios (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) y Bird y col., Science, 242, 423-426 (1988)). (Véase en general, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15-16 (1986).

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "Fv monocatenario", "anticuerpos monocatenarios", "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carecen de las regiones constantes, dentro de un polipéptido monocatenario. En general, un anticuerpo monocatenario comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. Pluckthun discute en detalle los anticuerpos monocatenarios en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 88/01649 y las Patentes de Estados Unidos n.º 4.946.778 y 5.260.203. En realizaciones específicas, los anticuerpos monocatenarios pueden también ser biespecíficos y/o humanizados.

Un "fragmento Fab" consta de una cadena ligera y de las regiones C<sub>H1</sub> y variable 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 Fab'" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de forma tal que se puede formar un enlace disulfuro intercadena entre dos cadenas pesadas, para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de forma tal que se forma un enlace disulfuro intercadena entre dos cadenas pesadas.

Los pesos moleculares y longitudes de los polímeros determinados mediante procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) se entenderán como siendo valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como "aproximadamente" X o "de forma aproximada" X, el valor establecido de X se comprenderá por ser preciso al ± 10 %.

La presente invención es a base del descubrimiento de las secuencias humanizadas de la región variable anti IL-31 de ser humano de ratón de los anticuerpos. El uso de estos anticuerpos como antagonistas de la IL-31 puede inhibir la inflamación en general, y de forma específica los síntomas de la dermatitis y de enfermedades pruriginosas. La memoria descriptiva describe la utilización de las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada de los anticuerpos que reconocen, se unen, y/o neutralizan al polipéptido IL-31. Tales regiones de la cadena ligera y pesada humanizadas se pueden fusionar a una región constante de inmunoglobulina, tal como por ejemplo, IgG4 o IgG1, y expresar en una diversidad de células hospedadoras. Las secuencias de la región variable anti IL-31 humanizadas descritas en el presente documento se generaron utilizando secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada anti IL-31 de ser humano de ratón de anticuerpos monoclonales descritos anteriormente en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/430.066, presentada el 8 de mayo de 2006 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-02752960).

- Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, que comprenden o consisten en una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada, y pueden ser quiméricos, humanizados, o fragmentos de anticuerpo que neutralizan, inhiben, reducen, previenen o minimizan los efectos de IL-31 sobre su receptor. Las consecuencias clínicas del anticuerpo o de los fragmentos de anticuerpo pueden ser una reducción de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, tales como la dermatitis, en particular la dermatitis atópica, y enfermedades pruriginosas y la enfermedad de Crohn, como se describe adicionalmente en el presente documento. En una realización, la dermatitis es dermatitis atópica. En otra realización, la dermatitis es prurigo nodular. En otra realización, la dermatitis es eccema. La reducción también puede ser una reducción del picor, el rascado, o la pérdida de pelo.
- La IL-31 es una citocina de linfocitos T recientemente descubierta, que cuando se sobreexpresa en ratones, da como resultado síntomas similares a dermatitis. Véase, Dillon, y col., *Nature Immunol.* 5: 752-760, 2004. IL-31 es el nombre HUGO (*The Human Genome Organisation*) para una citocina que se ha descrito anteriormente como Zcyto17rlig en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 10/352.554, presentada el 21 de enero de 2003 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003-0224487), ahora Patente de Estados Unidos n.º de Serie 7.064.186, Sprecher, Cindy y col., 2003. Véase también, Dillon, y col., *Nature Immunol.*, citado anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la IL-31 de ser humano se muestra en la SEQ ID NO: 24. El análisis tisular revela que se encuentra expresión de la IL-31 de ratón en testículos, cerebro, células CD90+, células de la próstata, glándula salival y en la piel.
- En la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 20030224487 se ha descrito al receptor heterodimérico de la IL-31 como zcytor17 (nombre HUGO, IL-31RA), el cual forma un heterodímero con el receptor beta de la Oncostatina M (OSMRbeta). La IL-31 se aisló a partir de una biblioteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica de ser humano activadas (CSPH), que se seleccionaron por CD3. CD3 es un marcador de superficie celular exclusivo de células de origen linfoide, en particular de linfocitos T.
- La inhibición, neutralización, o bloqueo de la transducción de señales mediante las moléculas que comprenden un dominio variable de la cadena ligera anti ser humano, de ratón humanizado y/o un dominio variable de la cadena pesada anti ser humano de ratón humanizado, denominadas en el presente documento "moléculas de unión al antígeno IL-31" o "antagonistas de la IL-31", se puede medir mediante varios ensayos conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, los ensayos que miden una reducción de la proliferación incluyen ensayos para la reducción de un colorante tal como AlamarBlue™ (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 de forma comercial de Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensayos de mitogénesis tales como la medición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina; ensayos de exclusión de colorante utilizando, por ejemplo, negro naftaleno o azul de tripano, captación de colorante utilizando diacetil-fluoresceína; y liberación de cromo. Véase, en general, Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed., Wiley-Liss, 1994. Además de lo anterior, véase la publicación de patente de Estados Unidos número 20030224487, (Sprecher, Cindy y col., 2003) para un ejemplo de células BaF3 que expresan el IL-31RA y el OSMRbeta de longitud completa o, como se muestra en los ejemplos de actividad descritos en el presente documento.
- Los procedimientos para la preparación de polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento (que incluyen ADN y ARN) son bien conocidos en la técnica. Se puede preparar ARN total utilizando extracción por isotiocianato de guanidinio seguida de aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin y col., *Biochemistry* 18: 52-94, 1979). Se prepara ARN Poli (A)<sup>+</sup> a partir del ARN total utilizando el procedimiento de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-12, 1972). Se prepara ADN complementario ADN (ADNc) a partir de ARN poli(A)<sup>+</sup> utilizando procedimientos conocidos. Como alternativa se puede aislar ADN genómico. Después se identifican y aíslan los polinucleótidos que codifican anticuerpos de IL-31 mediante, por ejemplo, hibridación o PCR.
- La presente divulgación también incluye moléculas de unión al antígeno de IL-31 humanizadas o antagonistas de la IL-31 que se unen a fragmentos funcionales de polipéptidos IL-31 y moléculas de ácido nucleico que codifican tales fragmentos funcionales. Una IL-31 "funcional" o fragmento de la misma como se define en el presente documento se caracteriza por su actividad proliferativa y de diferenciación, por su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas, o por su capacidad para unirse de forma específica a un anticuerpo anti IL-31 o a heterodímeros IL-31RA/OSMRbeta de estos receptores (ya sea solubles o inmovilizados). Por lo tanto, la presente divulgación proporciona adicionalmente moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que se unen a una molécula de polipéptido que comprende uno o más fragmentos funcionales de la IL-31.
- La presente divulgación también proporciona moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que se unen a fragmentos de polipéptido o péptidos que comprenden una porción que porta epítipo de un polipéptido IL-31 o un epítipo inmunogénico o epítipo antigénico. La unión de los anticuerpos a estos epítipos da como resultado la inhibición, bloqueo, neutralización, y/o reducción de la señal de transducción de la IL-31 sobre su receptor afín.

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-31 de ser humano se han descrito previamente en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/430.066, presentada el 8 de mayo de 2006 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-02752960), en trámite junto con la presente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos de ratón anti IL-31 de ser humano descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/850.006, presentada el 4 de septiembre de 2007, en trámite junto con la presente, y en la solicitud PCT US07/77555, presentada el 4 de septiembre de 2007, del mismo propietario que la presente. Estas secuencias de aminoácidos se utilizaron como material de partida para las secuencias humanizadas descritas en el presente documento. En concreto, la secuencia del anticuerpo de ratón anti IL-31 de ser humano fue a partir de un hibridoma con el número de clon 292.12.3.1.

La actividad de los anticuerpos como se describe en el presente documento se puede medir por su capacidad para inhibir, o reducir, la proliferación utilizando una diversidad de ensayos que miden proliferación y/o la unión a células que expresan el receptor IL-31RA. Son de particular interés los cambios en las células dependientes de la IL-31. Las líneas celulares adecuadas para modificar por ingeniería genética para ser dependientes de la IL-31 incluyen la línea celular BaF3 dependiente de la IL-3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot y col., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel y col., Blood 64: 786-790, 1984), y MO7e (Kiss y col., Leukemia 7: 235-240, 1993). Las líneas celulares dependientes de factores de crecimiento se pueden establecer de acuerdo con procedimientos publicados (por ejemplo, Greenberger y col., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter y col., en Baum y col. Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980). La actividad de los anticuerpos anti IL-31 humanizados o antagonistas también se puede medir en el ensayo de proliferación de BaF3, el ensayo Biacore, o los ensayos NHK descritos en el presente documento.

En una realización, el dominio de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina de ser humano  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ . Dicha región constante puede ser la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina de ser humano  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  o  $\gamma 4$ .

En otra realización, el dominio de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina de ser humano  $\kappa$  o  $\lambda$ .

En otra realización, la cadena constante pesada es  $\gamma 4$  de ser humano, la cual es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad de activación del complemento. En otra realización, la cadena constante pesada es  $\gamma 1$  de ser humano.

La inmunoglobulina se puede seleccionar de cualquiera de las clases principales de inmunoglobulinas, que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y de cualquier subclase o isotipo, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA-1 e IgA-2.

La inhibición de la actividad de la IL-31 se puede medir mediante varios ensayos. Además de los ensayos desvelados en el presente documento, se puede probar la inhibición de la actividad de IL-31 en las muestras en una diversidad de ensayos diseñados para medir unión al receptor, la estimulación/inhibición de las respuestas celulares dependientes de la IL-31 o la proliferación de células que expresan el receptor IL-31RA.

Un polipéptido de unión a IL-31, que incluye moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31, también se pueden utilizar para la purificación de ligando. El polipéptido se inmoviliza sobre un soporte sólido, tal como esferas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada, o materiales similares que son estables en las condiciones de utilización. Los procedimientos para unir polipéptidos a soportes sólidos son conocidos en la técnica, e incluyen la química de aminas, activación por bromuro de cianógeno, activación por N-hidroxisuccinimida, activación por epóxido, activación por sulfhidrilo y activación por hidracida. El medio resultante en general estará configurado en la forma de una columna, y los líquidos que contienen ligando se pasan a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. Después se eluye el ligando utilizando cambios en la concentración de sal, agentes caotrópicos (guanidinio HCl), o el pH, para romper la unión ligando-receptor.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se consideran que están unidas de forma específica si: 1) muestran un nivel de umbral de la actividad de unión, y 2) no reaccionan de forma cruzada de forma significativa con moléculas de polipéptido relacionadas. Se determina un nivel de umbral de unión si las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 en el presente documento se unen a un polipéptido, péptido o epítopo de la IL-31 con una afinidad por lo menos 10 veces mayor que la afinidad de unión al polipéptido de control (que no es la IL-31). Es preferente que los anticuerpos muestren una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6 M^{-1}$  o mayor, preferentemente  $10^7 M^{-1}$  o mayor, más preferentemente  $10^8 M^{-1}$  o mayor, y muy preferentemente  $10^9 M^{-1}$  o mayor. La afinidad de unión de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados la puede determinar fácilmente un experto en la materia, por ejemplo mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Se demuestra si las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 no reaccionan de forma cruzada de forma significativa con moléculas de polipéptido relacionadas, por ejemplo, mediante la detección del polipéptido IL-31 pero no polipéptidos relacionados conocidos, por las moléculas de unión al antígeno de IL-31 o los antagonistas

de la IL-31, utilizando un análisis por transferencia de Western convencional (Ausubel y col., citado en el presente documento). La exploración también se puede realizar utilizando polipéptidos IL-31 que no son de ser humano, y mutantes de IL-31. Además, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 pueden "explorarse frente" a polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une de forma específica a los polipéptidos IL-31. Por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 se absorben a polipéptidos relacionados adheridos a matriz insoluble; las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 específicos para la IL-31 fluirán a través de la matriz en las condiciones de tampón apropiadas. Anticuerpos: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, y col., (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se caracterizan por su capacidad para bloquear, inhibir, prevenir o reducir la unión al receptor cuando se cultivan en presencia de las proteínas recombinantes purificadas IL-31 de ser humano. Por ejemplo, Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden caracterizar de varios modos que incluyen unión (es decir, determinar si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa, y neutralización.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados de la invención se muestran en la Tabla 1, a continuación, y en la Figura 1.

En la Tabla 1, a continuación, para los clones que tienen la designación de "12VH1" (es decir, los clones 7, 9, 10, 13-18, y 26-36): el término "*fback*" significa LC(*back*) + HC(*fback*); el término "LC(*back*)" significa LC(G66R, G68E, D70Q, F71Y, T72S); y el término "HC(*back*)" significa HC(F29L, M69L, R71A, T73K, V78A, R94F). De manera similar, en la Tabla 1, a continuación, para los clones que tienen la designación de "12VH5" (es decir, los clones 8, 11 y 21-24): el término "*fback*" significa LC(*back*) + HC(*fback*); el término "LC(*back*)" significa LC(G66R, G68E, D70Q, F71Y, T72S); y el término "HC(*back*)" significa HC(G24A, S28T, F29L, I69L, S70T, R94F).

Tabla 1: Construcciones 292.12.3.1 humanizadas

Número de clon	Descripción de la mutación	SEQ ID NO: de la cadena pesada	SEQ ID NO: de la cadena ligera
7	12VH1-gly+ <i>fback</i>	25	26
8	12VH5-gly+ <i>fback</i>	27	26
9	12VH1-gly+HC( <i>fback</i> )	25	28
10	12VH1-gly+LC( <i>fback</i> )	29	26
11	12VH5-gly+HC( <i>fback</i> )	27	28
13	12VH1-gly+HC(F29L, M69L, R71A, T73K, V78A)+LC( <i>fback</i> )	30	26
14	12VH1-gly+HC(M69L, R71A, T73K, V78A, R94F)+LC( <i>fback</i> )	31	26
16	12VH1-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(G66R, G68E, D70Q, T72S)	25	32
17	12VH1-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(D70Q, F71Y, T72S)	25	33
18	12VH1-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(G66R, G68E, F71Y)	25	34
21	12VH5-gly+HC(G24A, S28T, F29L, R94F)+LC( <i>fback</i> )	35	26
22	12VH5-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(G66R, G68E, D70Q, T72S)	27	32
23	12VH5-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(D70Q, F71Y, T72S)	27	33
24	12VH5-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(G66R, G68E, F71Y)	27	34
25	12VH1-gly+HC(F29L,R94F)+LC(F71Y)	36	37
26	12VH1-gly+HC( <i>fback</i> )+LC(F71Y)	25	37
27	12VH1-gly+HC(F29L,M69L,R94F)+LC(F71Y)	38	37
28	12VH1-gly+HC(F29L,R71A,R94F)+LC(F71Y)	39	37
29	12VH1-gly+HC(F29L,T73K,R94F)+LC(F71Y)	40	37



(continuación)

Número de clon	Descripción de la mutación	SEQ ID NO: de la cadena pesada	SEQ ID NO: de la cadena ligera
30	12VH1-gly+HC(F29L,V78A,R94F)+LC(F71Y)	41	37
31	12VH1-gly+HC(F29L,M69L,R71A,V78A,R94F)+LC(F71Y)	42	37
32	12VH1-gly+HC(F29L,R71A,V78A,R94F)+LC(F71Y)	43	37
33	12VH1(germ)-gly+ <i>fback</i>	44	26
34	12VH1-gly+HC(F29L,R94F)+LC( <i>fback</i> )	36	28
35	12VH1-gly+HC(F29L,R94F)	36	28
36	12VH1(germ)-gly+HC(F29L,T73K,R94F)+LC(F71Y)	45	37

5 Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden producirse mediante cualquier técnica conocida de por sí en la técnica, tal como mediante tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligamiento, o combinaciones de las mismas. En una realización, los anticuerpos de la presente invención se producen mediante tecnologías recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un correspondiente ácido nucleico en una célula hospedadora adecuada. El polipéptido producido puede estar glucosilado o no, puede contener otras modificaciones postraduccionales dependiendo del tipo de célula hospedadora utilizado. Muchos libros y revisiones proporcionan enseñanzas de cómo clonar y producir proteínas recombinantes utilizando vectores y células hospedadoras procariontas o eucariotas, tales como algunos títulos de la serie "A Practical Approach" publicada por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

15 La memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos más arriba o a continuación, o una hebra complementaria o secuencia degenerada de los mismos. En este sentido, la expresión "molécula de ácido nucleico" abarca todos los tipos distintos de ácidos nucleicos, incluyendo, pero sin limitación, ácidos desoxirribonucleicos (por ejemplo, ADN, ADNc, ADNg, ADN sintético, etc.), ácidos ribonucleicos (por ejemplo, ARN, ARNm, etc.) y ácidos nucleicos peptídicos (ANP). En una realización preferente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN, tal como una molécula de ADN bicatenario o una molécula de ADNc. El término "aislado" significa moléculas de ácido nucleico que se han identificado y separado a partir de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está normalmente asociada en la fuente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada es otra distinta que en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica tal como existe en las células naturales. Una secuencia degenerada denomina cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que una secuencia de nucleótidos de referencia, pero que comprende una secuencia de nucleótidos distinta como resultado de la degeneración del código genético.

25 La memoria descriptiva describe un vector que comprende ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente o a continuación. El vector puede ser cualquier vector de clonación o de expresión, integrativo o de replicación autónoma, funcional en cualquier célula procarionta o eucariota. En particular, el vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, fago, episoma, cromosoma artificial, y similares. El vector puede comprender las secuencias codificantes de la cadena pesada y de la ligera, o cualquiera de las secuencias codificantes de las cadenas ligera y pesada. Si el vector debe comprender secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera, las cadenas pesada y ligera pueden cada una estar unidas operativamente a un promotor. El promotor puede ser el mismo o distinto para la cadena pesada y la ligera. Las cadenas pesada y ligera también pueden estar unidas operativamente a un promotor único, en este caso las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera pueden preferentemente estar separadas mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Los promotores adecuados para la expresión de genes eucariotas son, por ejemplo, promotores obtenidos de genes virales tales como el promotor del citomegalovirus (CMV) murino o humano o del virus del sarcoma de rous (VSR), que son bien conocidos para el experto en la materia. El vector puede comprender elementos reguladores, tales como un promotor, terminador, potenciador, marcador de selección, origen de replicación, etc. Los ejemplos específicos de tales vectores incluyen plásmidos procariontas, tales como los plásmidos pBR, pUC o pcDNA; vectores virales, que incluyen vectores retrovirales, adenovirales o de AVA; bacteriófagos; baculovirus; BAC o YAC, etc., como se discutirá a continuación. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas para el experto.

45 La memoria descriptiva describe una célula hospedadora recombinante, en la que dicha célula comprende una molécula de ácido nucleico o un vector como se define anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula

procariota o eucariota. Los ejemplos de células procariotas incluyen bacterias, tales como *E. coli*. Los ejemplos de células eucariotas son células de levadura, células vegetales, células de mamífero y células de insecto que incluyen cualquier cultivo celular primario o línea celular establecida (por ejemplo, 3T3, Vero, HEK293, TN5, etc.). Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de proteínas glucosiladas se obtienen a partir de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario de ser humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón de ser humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado de ser humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Las células de mamífero particularmente preferentes de la presente invención son las células CHO. Adicionalmente, las células de mamífero particularmente preferente adecuadas para la expresión de los anticuerpos de la invención son células murinas, tales como las células de mieloma de ratón (NSO).

Como se desvela anteriormente en el presente documento, los anticuerpos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida de por sí en la técnica, tales como mediante tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligaciones, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, los receptores solubles se producen mediante tecnologías recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico correspondiente en una célula hospedadora adecuada. La memoria descriptiva describe un procedimiento de producción de un anticuerpo de la presente invención, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico, y la recuperación del polipéptido producido. El procedimiento de producción puede adicionalmente comprender la etapa de formulación del polipéptido en una composición farmacéutica. El polipéptido producido puede estar glucosilado o no, o puede contener otras modificaciones postraduccionales dependiendo del tipo de célula hospedadora utilizada. Muchos libros y revisiones proporcionan enseñanzas sobre como clonar y producir proteínas recombinantes utilizando vectores y células hospedadoras procariotas y eucariotas, tales como algunos títulos en la serie "A Practical Approach" publicado por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Los vectores a utilizar en el procedimiento de producción de un anticuerpo pueden ser vectores episomales o de no integración/de integración de forma homóloga, que se pueden introducir en las células hospedadoras apropiadas mediante cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación por fosfato de calcio, microinyección directa, etc.). Los factores de importancia en la selección de un plásmido, vector viral o retroviral particular incluyen: la facilidad con que las células destinatarias que contienen el vector se pueden reconocer y seleccionar a partir de las células destinatarias que no contienen al vector; el número de copias del vector que se desea en un hospedador particular; y si es conveniente ser capaz de "transferir" el vector entre células hospedadoras de distintas especies. Los vectores deberían permitir la expresión del polipéptido o de las proteínas de fusión, descritas en el presente documento, en células hospedadoras procariotas o eucariotas, bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas de iniciación/terminación de la transcripción, que se eligen para que estén constitutivamente activas o sean inducibles en dicha célula. Después, se puede aislar una línea celular esencialmente enriquecida en tales células para proporcionar una línea celular estable.

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas, y se cultivan en medio nutriente convencional modificado como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Un experto puede seleccionar sin excesiva experimentación las condiciones del cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares. En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., citado anteriormente.

Para las células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, células de levadura, de insecto o de mamífero), se pueden emplear distintas secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción, dependiendo de la naturaleza del hospedador. Pueden obtenerse de fuentes virales, tales como adenovirus, virus del papiloma, virus del simio o similares, en donde las señales reguladoras se asocian con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Los ejemplos son el promotor TK del virus Herpes, el promotor temprano del SV40, el promotor del gen gal4 de levadura, etc. Se puede seleccionar señales reguladoras de iniciación de la transcripción que permitan la represión y activación, de forma que se pueda modular la expresión de los genes. Las células que se han transformado de forma estable mediante el ADN introducido se puede seleccionar también introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células hospedadoras que contienen el vector de expresión. El marcador también puede proporcionar fototrofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas, por ejemplo, antibióticos, o a metales pesados tales como el cobre, o similares. El gen del marcador de selección puede estar unido de forma directa a las secuencias de ADN a expresar (por ejemplo, en el mismo vector), o se lo puede introducir en la misma célula mediante cotransfección. Para la síntesis óptima de proteínas de la invención también pueden ser necesarios

elementos adicionales.

Las células procariotas adecuadas incluyen bacterias (tales como *Bacillus subtilis* o *E. coli*) transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinante. Tales células normalmente producen proteínas que comprenden un resto metionina N terminal. Las células preferentes a utilizar en la presente invención son células hospedadoras eucariotas, por ejemplo células de mamífero, tales como células de ser humano, mono, ratón, y de ovario de hámster chino (CHO), debido a que proporcionan modificaciones postraduccionales a las moléculas de proteína, que incluyen el pegamiento correcto o la glucosilación en los sitios correctos. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células de riñón embrionario de ser humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster lactante (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón de perro (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin y col., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986)), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650), melanoma de Bowes y carcinoma hepatocelular de ser humano (por ejemplo, Hep G2), células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) y una serie de varias líneas celulares. Células hospedadoras eucariotas alternativas son las células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, etc.) transformadas con vectores de expresión de levadura. También las células de levadura pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales de péptidos que incluyen glucosilación. Existen varias estrategias del ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y alto número de copias de plásmidos que se pueden utilizar para la producción de las proteínas deseadas en levadura. Las células de levadura reconocen secuencias líder en productos de genes de mamífero clonados y secretan polipéptidos que portan secuencias líder (es decir, prepeptidos).

Para la producción prolongada de alto rendimiento de un polipéptido recombinante, es preferente la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el polipéptido de interés se pueden transformar utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen de marcador de selección en el mismo vector o en uno separado. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas al medio selectivo. El fin del marcador de selección es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan las secuencias introducidas de forma satisfactoria. Los clones resistentes de las células transformadas de forma estable se pueden hacer proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular. Después se puede aislar una línea celular esencialmente enriquecida en tales células para proporcionar una línea celular estable.

Un procedimiento particularmente preferente de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención es a través del uso de la amplificación de la dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR, mediante el uso de niveles crecientes de metotrexato como se describe en el documento US 4.889.803. El polipéptido obtenido puede estar en una forma glucosilada.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden expresarse en otras células eucariotas, tales como células de aves, de hongos, de insectos, de levadura o vegetales. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz para introducir genes clonados en células de insecto. Los materiales para los sistemas de expresión de baculovirus/célula de insecto están disponibles de forma comercial en la forma de kit de, entre otros, Invitrogen.

Además de las tecnologías del ADN recombinante, los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante tecnologías de síntesis química. Los ejemplos de las tecnologías de síntesis química son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como una síntesis de fase sólida, por ejemplo, el aminoácido que corresponde al extremo carboxilo del polipéptido a sintetizar está unido a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos y, mediante la repetición alternada de reacciones (por ejemplo, mediante condensación secuencial de aminoácidos con sus grupos aminos y grupos funcionales de cadenas laterales protegidos con grupos protectores apropiados), la cadena polipeptídica se extiende. Los procedimientos de síntesis en fase sólida se clasifican en su mayor parte mediante el procedimiento tBoc y el procedimiento Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado. Las proteínas totalmente sintéticas se desvelan en la literatura (Brown A y col., 1996).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir, formular, administrar, o utilizar de forma genérica en otras formas alternativas que pueden ser preferentes de acuerdo con el procedimiento deseado de uso y/o de producción. Las proteínas de la invención pueden modificarse de forma postraduccionales, por ejemplo, mediante glucosilación. Los polipéptidos o proteínas de la invención se pueden proporcionar en una forma biológicamente activa aislada (o purificada), o como precursores, derivados y/o sales de los mismos.

Los conjugados o complejos útiles también se pueden generar mejorando los agentes en términos de eficacia de entrega de fármacos. Para este fin, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden estar en la forma de conjugados o complejo activos con moléculas tales como polietilenglicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris JM y Chess RB, 2003; Greenwald RB y col., 2003; Pillai O y Panchagnula R, 2001). En este sentido, la presente divulgación contempla anticuerpos modificados de forma química como se desvela en el presente documento, en que el anticuerpo está unido a un polímero. Normalmente, el polímero es soluble en agua de forma

que el conjugado no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De este modo se puede controlar el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es un propionaldehído de polietilenglicol, o mono-alcoxi (C1-C10), o derivados ariloxi de los mismos (véase, por ejemplo, Harris, y col., patente de Estados Unidos N.º 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Además, para producir los conjugados se puede utilizar una mezcla de polímeros. Los conjugados utilizados para terapia pueden comprender residuos de polímero solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-(C1-C10) alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinilpirrolidona) PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de propileno/etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en carbohidrato. El PEG adecuado puede tener un peso molecular desde aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, que incluye, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua.

Los ejemplos de conjugados comprenden cualquiera de los anticuerpos desvelados anteriormente en el presente documento y un residuo de óxido de polialcilo acoplado al extremo N de dicho receptor celular. El PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como una ilustración, cualquiera de los anticuerpos desvelados en el presente documento se puede modificar con PEG, un procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27: 290 (1994), y Francis y col., *Int J Hematol* 68: 1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación se puede realizar mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En una estrategia alternativa, los conjugados se forman mediante la condensación de PEG activado, en la que un grupo hidroxilo o amino terminal del PEG se ha reemplazado con un conector activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., patente de Estados Unidos N.º 5.382.657). Preferentemente, todas estas modificaciones no afectan de forma significativa la capacidad del anticuerpo para unirse a la IL-31 de ser humano.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender un resto de aminoácido N terminal adicional, preferentemente una metionina. De hecho, dependiendo del sistema de expresión y de las condiciones, los polipéptidos se pueden expresar en una célula hospedadora recombinante con una metionina inicial. Después, este aminoácido adicional puede mantenerse en la proteína recombinante resultante, o eliminarse por medio de una exopeptidasa, tal como la Metionina Aminopeptidasa, de acuerdo con los procedimientos desvelados en la literatura (Van Valkenburgh HA y Kahn RA, *Methods Enzymol.* (2002) 344:186-93; Ben-Bassat A, *Bioprocess Technol.* (1991) 12:147-59).

Como se mostrará en la parte de ejemplos del presente documento, los anticuerpos de ratón anti IL-31 de ser humano pueden incluir sitios de glucosilación potenciales en sus dominios variables. Por ejemplo, el clon 292.12.3.1 porta un sitio de glucosilación en la región marco conservada FR1 del dominio variable de la cadena pesada. Los inventores de la presente invención han encontrado ahora que dicho sitio de glucosilación no es necesario para mantener una buena afinidad de unión por la IL-31 de ser humano. Además, suprimir este sitio de glucosilación (por ejemplo, mediante mutación) tiene un efecto positivo en la termoestabilidad del anticuerpo. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los anticuerpos como se desvelan en el presente documento, no tienen el sitio de glucosilación en sus dominios variables.

Mediante una diversidad de procedimientos se puede probar la neutralización de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 generados mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo de luciferasa como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada (véase número de publicación 20030224487, Sprecher, Cindy y col., 2003). Además, la neutralización se puede probar midiendo un descenso en la producción de quimiocinas proinflamatorias tales como TARC y MDC, de cultivos de queratinocitos en presencia de ligando y del anticuerpo monoclonal. La neutralización también se puede medir mediante los ensayos *in vivo* e *in vitro* descritos en el presente documento.

La reducción de TARC y de MDC en respuesta a los anticuerpos anti IL-31 humanizados y los antagonistas descritos en el presente documento se puede medir en un modelo de ratón de DA como sigue:

Procedimiento I) Ratones NC/Nga (CRL Japón) machos de seis semanas se sensibilizan por vía intradérmica con 50 µg de extracto de ácaro del polvo (*D. pteronyssinus*, Indoor Biotechnologies) tres veces por semana en el lomo y se valoran las lesiones similares a la DA. Después de cinco semanas de sensibilización los ratones se someten a eutanasia y se extirpan las orejas derechas y se colocan en un único pocillo de una placa de cultivo de 48 pocillos (Corning) complementado con RPMI+SFB al 2 % (GIBCO Invitrogen). Las placas se colocan en incubadores de CO2 al 5 % de higrometría controlada. Después de 24 horas se recogen los sobrenadantes y se congelan a -20 °C hasta los análisis adicionales.

Procedimiento II) Ratones NC/Nga (CRL Japón) hembra de doce semanas se sensibilizan por vía intradérmica con 10 µg de SEB (Toxin Technology) en la oreja y en el lomo tres veces por semana. Se valoran en los ratones las

lesiones similares a DA. Después de 5 semanas de sensibilización los ratones se someten a eutanasia y se toman de la oreja inyectada de cada ratón se toman perforaciones de biopsia de 6 mm y se colocan en un único pocillo de una placa de cultivo de 48 pocillos complementado con RPMI+SFB al 2 %. Las placas se colocan en incubadores de CO<sub>2</sub> al 5 % de higrometría controlada. Después de 24 horas se recogen los sobrenadantes y se congelan a -20 °C hasta los análisis adicionales.

Los grupos de ratones de ambos estudios se tratan por vía intraperitoneal con moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas o los anticuerpos o antagonistas de IL-31 humanizados dos veces por semana comenzando después de 1 o 2 semanas de sensibilización. Las concentraciones de TARC y de MDC en las muestras de sobrenadante de 24 horas se miden mediante ELISA convencional (R&D Systems).

- 10 En una realización, Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos mediante disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden el dominio VL o el VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, que incluyen anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región/regiones variable(s) (es decir, las SEQ ID NO: 25-45) solas o en combinación con la totalidad o con una porción de lo siguiente: región bisagra, dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>. También están incluidos en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de la(s) región/regiones variable(s) con una región bisagra, dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>. En otra realización, la región variable de la cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 25; 27; 29; 30; 31; 35; 36; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44, y 45, se pueden combinar con la región variable de la cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID NO: 26; 28; 32; 33; 34; y 37.
- 20 En otra realización, la memoria descriptiva proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano, que comprende un dominio variable de la cadena pesada humanizado y un dominio variable de la cadena ligera humanizado en los que el dominio variable de la cadena pesada humanizado y un dominio variable de la cadena ligera humanizado se seleccionan del grupo que consiste en: a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; b) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; c) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; d) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; e) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; f) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; g) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; h) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; i) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; j) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; k) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; l) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; m) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; n) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; o) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; p) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; q) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; r) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; s) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:



90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; p) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:37; q) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; r) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; s) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; t) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; u) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; v) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; w) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; x) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; y) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; y z) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En un aspecto, la memoria descriptiva proporciona un anticuerpo aislado seleccionado del grupo que consiste en: a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47; b) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49; y c) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51.

La presente divulgación también incluye moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas recombinantes o antagonistas de la IL-31 que son funcionalmente equivalentes a las descritas anteriormente. También se incluyen moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas modificadas o antagonistas de la IL-31 que proporcionan estabilidad mejorada y/o eficacia terapéutica. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, y una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteran de forma significativa y nociva la utilidad de unión a antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más restos de aminoácidos hasta el rediseño completo de una región siempre que se mantenga la utilidad terapéutica. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden modificar de forma postraduccional (por ejemplo, acetilación y fosforilación) o se pueden modificar de forma sintética (por ejemplo, el acoplamiento de un grupo de marcaje). Se comprende que Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados diseñados mediante el presente procedimiento pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que esencialmente no tienen efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, pero sin limitación, los derivados incluyen moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Mediante técnicas conocidas se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas, que incluyen, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. De manera adicional, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados comprenden las CDR de una inmunoglobulina de ratón donante y armazones de la cadena pesada y la cadena ligera de una inmunoglobulina de ser humano aceptora. Los procedimientos de fabricación del anticuerpo humanizado se desvelan en las Patentes de

Estados Unidos n.º 5.301.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370. Después, las CDR de estos anticuerpos pueden injertarse en cualquiera de los armazones de ser humano seleccionados que son conocidos en la técnica, para generar el anticuerpo humanizado deseado.

5 La memoria descriptiva describe moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que inhiben de forma competitiva la unión a la IL-31 de ser humano de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento. La inhibición competitiva se puede determinar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, utilizando los ensayos de unión competitiva descritos en el presente documento. En realizaciones preferentes, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo monoclonal de la invención al polipéptido en por lo menos el 90 %, por lo menos el 80 %, por lo menos el 70 %, por lo menos el 60 % o por lo menos el 50 %.

10 La memoria descriptiva describe moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que inhiben de forma competitiva la unión de un anticuerpo a un epítipo desvelado en el presente documento, como se determina mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento. En realizaciones preferentes, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión al epítipo en por lo menos el 90 %, por lo menos el 80 %, por lo menos el 70 %, por lo menos el 60 % o por lo menos el 50 %.

15 Se pueden aumentar las semividas *in vivo* de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados modificando (por ejemplo, sustituyendo, delecionando o añadiendo) restos de aminoácidos identificados como que están implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales n.º WO 97/34631 y WO 02/060919, o acoplado moléculas de polímero tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. El PEG se puede acoplar con o sin un conector multifuncional a través ya sea de conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o de grupos epsilon-amino presentes en los restos lisina. Se utilizará la derivatización de polímero lineal o ramificado que da como resultado la mínima pérdida de actividad biológica. El grado de conjugación se controlará detenidamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no haya reaccionado se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

20 La presente divulgación incluye criterios por los cuales se elige un número limitado de aminoácidos en el armazón de una cadena de inmunoglobulina humanizada, para ser los mismos que los aminoácidos en las posiciones en el donante en lugar que en el aceptor, para aumentar la afinidad de un anticuerpo que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada.

25 Además de las inmunoglobulinas humanizadas descritas de forma específica en el presente documento, se pueden diseñar y fabricar fácilmente otras inmunoglobulinas modificadas "esencialmente homólogas" a las secuencias nativas, utilizando diversas técnicas del ADN recombinante bien conocidas para los expertos en la materia. Se puede utilizar una diversidad de regiones marco conservadas de ser humano distintas, individualmente o en combinación, como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, las modificaciones de los genes se pueden llevar a cabo fácilmente mediante una diversidad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida (véase, Gillman y Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979) y S. Roberts y col., *Nature*, 328, 731-734 (1987)).

30 Los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento incluyen fragmentos así como anticuerpos intactos. Normalmente, estos fragmentos compiten por la unión al antígeno con el anticuerpo intacto a partir del cual se obtuvieron. Los fragmentos normalmente se unen con una afinidad de por lo menos  $10^7$  M.<sup>-1</sup>, y más normalmente  $10^8$  o  $10^9$  M.<sup>-1</sup> (es decir, dentro de los mismos intervalos que el anticuerpo intacto). Los fragmentos de anticuerpo humanizados incluyen cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas del ADN recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmoglobulinas intactas.

35 Para los detalles sobre la humanización de anticuerpos, véanse las Patentes Europeas n.º EP 239.400, EP 592.106, y EP 519.596; Publicaciones Internacionales n.º WO 91/09967 y WO 93/17105; las Patentes de Estados Unidos n.º 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 y col., 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska y col., 1994, *PNAS* 91: 969-973; Tan y col., 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-1125; Caldas y col., 2000, *Protein Eng.* 13: 353-360; Morea y col., 2000, *Methods* 20: 267-279; Baca y col., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684; Roguska y col., 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904; Couto y col., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Sup): 5973s-5977s; Couto y col., 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-1722; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-410; Pedersen y col., 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-973; Jones y col., 1986, *Nature* 321: 522-525; Reichmann y col., 1988, *Nature* 332: 323-329; y Presta, 1992, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596.

40 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Estos fragmentos se pueden obtener a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)), o producir de



forma directa mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar de forma directa a partir de *E. coli* y acoplar de forma química para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab') se pueden aislar de forma directa de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Serán obvias para el experto otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Adicionalmente, los ejemplos de las técnicas que se pueden utilizar para producir Fv y anticuerpos monocatenarios incluyen las descritas en las patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston y col., Methods in Enzymology 203: 46-88 (1991); Shu y col., PNAS 90: 7995-7999 (1993); y Skerra y col., Science 240: 1038-1040 (1988).

La presente divulgación abarca anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados de forma química (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente por lo menos 10, 20 o 50 aminoácidos del polipéptido) descrito en el presente documento para generar proteínas de fusión. Por lo tanto, la divulgación también concierne a inmunocombinados que comprenden al anticuerpo descrito 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 divulgación incluye adicionalmente composiciones que comprenden los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, que comprenden un epítipo inmunogénico o antigénico) fusionados o conjugados con secuencias de polipéptido heterólogas (por ejemplo, dominios de anticuerpo que no sean las regiones variables). Por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden fusionar o conjugar a una región Fc de anticuerpo, o porción de la misma. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar con el dominio constante de las inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o porciones del mismo (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>), o cualquier combinación de los mismos y porciones de los mismos, dando como resultado polipéptidos quiméricos. La porción de anticuerpo fusionada a un polipéptido descrito en el presente documento puede comprender a la región constante, la región bisagra, dominio C<sub>H1</sub>, dominio C<sub>H2</sub> y dominio C<sub>H3</sub> o cualquier combinación de los dominios completos o porciones de los mismos. Los polipéptidos pueden también fusionarse o conjugarse a las porciones de anticuerpo anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros a través de enlaces disulfuro entre las porciones Fc. Se pueden fabricar formas multiméricas superiores fusionando los polipéptidos con las porciones de IgA e IgM. Se conocen en la técnica los procedimientos para fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención a las porciones de anticuerpo. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las Publicaciones PCT WO 96/04388; WO 91/06570; Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Zheng y col., J. Immunol. 154: 5590-5600 (1995); y Vil y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341(1992). A modo de otro ejemplo no limitante, los polipéptidos y/o anticuerpos descritos en el presente documento (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar con albúmina (que incluye, pero sin limitación, seroalbúmina de ser humano recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.876.969, expedida el 2 de marzo de 1999, la Patente EP 0 413 622, y la Patente de Estados Unidos n.º 5.766.883, expedida el 16 de junio de 1998, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad)).

Los polipéptidos y/o anticuerpos de la presente invención (que incluyen fragmentos o variantes de los mismos) se pueden fusionar al extremo N o al C terminal de la proteína heteróloga (por ejemplo, polipéptido Fc de inmunoglobulina o polipéptido de seroalbúmina de ser humano). También están abarcados en la invención los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de la invención.

Como se discute anteriormente, los polipéptidos de la presente divulgación se pueden fusionar o conjugar a las porciones de anticuerpo anteriores para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los polipéptidos de la presente divulgación se pueden fusionar o conjugar con las porciones de anticuerpo anteriores para facilitar la purificación. Un ejemplo comunicado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido de CD4 de ser humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas de mamífero. (Véase, por ejemplo, el documento EP 394.827; Traunecker y col., Nature 331: 84-86 (1988)). Se ha demostrado para antígenos (por ejemplo, insulina) conjugados a un compañero de unión a FcRn tal como fragmentos de IgG o Fc, la entrega potenciada de un antígeno, a través de la barrera epitelial, al sistema inmunitario (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). Los polipéptidos de la presente divulgación, 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 que la proteína monomérica secretada o fragmento de proteína solo (Fountoulakis y col., J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)). En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es benéfica en la terapia y el diagnóstico, y así puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP A 232.262). Como alternativa, sería deseable la delección de la parte Fc después de que se haya expresado, detectado y purificado la proteína de fusión. Por ejemplo, la porción Fc puede impedir la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se utiliza como un antígeno para inmunizaciones. Por ejemplo, las proteínas de ser humano en el descubrimiento de fármacos, tal como la IL-5h, se han fusionado con porciones Fc para el propósito de ensayos de exploración de alto

rendimiento para identificar antagonistas de la IL-5h. (Véase, D. Bennett y col., J. Molecular Recognition 8: 52-58 (1995); K. Johanson y col., J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995)). Tales técnicas también incluyen, pero sin limitación, el uso de agentes de conjugación bifuncionales (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

Además, los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos) se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido que facilite su purificación. En una realización adicional, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos en el presente documento (que incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos que codifican epítomos inmunogénicos y/o antigénicos) también se pueden recombinar con un gen de interés como una etiqueta de epítomo (por ejemplo, el indicador hemaglutinina ("HA") o el indicador *flag*) para ayudar a la detección y purificación del polipéptido expresado. En realizaciones preferentes, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexahistidina, tal como el indicador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles de forma comercial. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptido útiles para purificación incluyen, pero sin limitación, el indicador "HA", que corresponde a un epítomo obtenido de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984)), y el indicador *flag*.

La presente divulgación abarca adicionalmente moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados, conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 se pueden utilizar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o evolución de una enfermedad pruriginosa como parte de un procedimiento de pruebas clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento, diagnóstico, detección y/o régimen de prevención dado. La detección se puede facilitar acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones, utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como productos diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscentes incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .

Adicionalmente, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden conjugar a un residuo terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citotático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados descritos en el presente documento se pueden utilizar para modificar una dada respuesta biológica, el agente terapéutico o residuo de fármaco no debe considerarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo 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 diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón beta, 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 modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor estimulante de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de IL-31 humanizados también pueden estar acopladas a soportes sólidos, los cuales son particularmente útiles para inmunoensayos o la purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las técnicas para conjugar tal residuo terapéutico a los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson y col. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987);

5 Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 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 y col. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

10 Como alternativa, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como describe Segal en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980.

Se puede utilizar como un producto terapéutico una molécula de unión al antígeno IL-31, o antagonista de la IL-31, humanizado, con o sin un residuo terapéutico conjugado con ella, administrada sola o en combinación con factor o

15 factores citotóxico(s) y/o citocina(s).

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden utilizar para señalar con un indicador a las células que expresan IL-31; para aislar IL-31 mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles circulantes de polipéptidos IL-31; para detectar o cuantificar IL-31 soluble como un marcador de una patología o enfermedad subyacente; en los procedimientos analíticos que emplean

20 FACS; para la exploración de bibliotecas de expresión; para la generación de anticuerpo antiidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de IL-31 *in vitro* e *in vivo*. Los indicadores o etiquetas directos adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los indicadores o etiquetas indirectos pueden disponer del uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anticomplemento como

25 intermediarios. En el presente documento, los anticuerpos pueden también estar conjugados de forma directa o indirecta a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden utilizarse para el diagnóstico *in vivo* o en aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos para la IL-31 o fragmentos de los mismos se pueden utilizar *in vitro* para detectar en ensayos a la IL-31 desnaturalizada o a fragmentos de la misma, por ejemplo transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

30 Las moléculas detectables adecuadas pueden estar acopladas de forma directa o indirecta al polipéptido o anticuerpo, e incluir radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden estar acopladas de forma directa o indirecta al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, difteria, toxina, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como

35 radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o iridio-90 (ya sea directamente acoplado al polipéptido o anticuerpo o indirectamente acoplados por medio, por ejemplo, de un residuo quelante). Los polipéptidos o anticuerpos se pueden conjugar también a fármacos citotóxicos, tales como la adriamicina. Para el acoplamiento indirecto de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica se puede conjugar con un miembro de un par complementario/anticomplementario, en donde el otro miembro está unido al polipéptido o

40 porción de anticuerpo. Para estos fines, biotina/estreptavidina es un par complementario/anticomplementario ejemplar.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 de la presente invención se pueden medir por su capacidad para inhibir, bloquear o neutralizar el ligando IL-31, como se determina mediante diversos modelos *in vivo* conocidos en la técnica y descritos en el presente documento, que incluyen pero sin limitación, el modelo

45 NC/Nga, el modelo epicutáneo Ova, el modelo de hipersensibilidad crónica, y el modelo de hapteno crónico.

Se ha implicado en la patología de las enfermedades cutáneas de seres humanos a los linfocitos T residentes de la piel y a los queratinocitos epidérmicos. En seres humanos el ARNm y la expresión de proteína IL-31 está restringida a la población de linfocitos T CLA+ de movimiento dirigido a la piel. Véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos número 11/353.427, presentada el 14 de marzo de 2006, (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-0188499) y Solicitud de Patente de Estados Unidos número 11/353.454, presentada el 14 de marzo de 2006, (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-0188500). Como tal, un antagonista para IL-31, que incluye un anticuerpo o antagonista de receptor, será útil en el tratamiento de enfermedades cutáneas y epidérmicas que

50 tengan expresión de linfocitos T CLA+. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, reacciones alérgicas inducidas por fármacos, virus con tropismo cutáneo y prurito viral asociado, vitíligo, linfoma de linfocitos T cutáneo, alopecia areata, acné rosácea, acné vulgaris, prurigo nodular y pénfigo vesicular. Los marcadores de quimiocinas tales como TARC y MDC son útiles para medir el efecto de un anticuerpo monoclonal neutralizante para la IL-31. Los efectos inhibidores del tratamiento con moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento pueden medirse controlando los niveles de TARC y MDC.

60

Dermatitis por contacto

La dermatitis por contacto alérgica se define como una reacción inmunitaria mediada por linfocitos T contra un antígeno que entra en contacto con la piel. Se considera que la población de linfocitos T CLA+ está implicada en el inicio de la dermatitis debido a que las respuestas de linfocitos T dependientes de alérgeno están confinadas en gran medida a la población de células CLA+ (Véase Santamaría-Babi, L.F., y col., J Exp Med: 181, 1935, (1995)). Datos recientes han encontrado que solo los linfocitos T de memoria (CD45RO+) CD4+ CLA+, y no los CD8+, proliferan y producen citocinas de tipo 1 (IFN) y de tipo 2 (IL-5) en respuesta al níquel, un alérgeno de la hipersensibilidad por contacto común. Además, las células que expresan CLA en combinación con CD4, CD45RO (memoria) o CD69 están aumentadas después de la estimulación específica por níquel, y expresan los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR4, CCR10, pero no CCR6. Véase, Moed, H. y col., Br J Dermatol: 51, 32, (2004).

En modelos animales, se ha demostrado que la dermatitis por contacto alérgica es dependiente de linfocitos T y que los linfocitos T sensibles a la alergia migran al sitio de la aplicación del alérgeno. Véase en general: Engeman T.M., y col., 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). Debido a que los linfocitos T CLA+ producen IL-31 y que la estimulación por IL-31 de los queratinocitos de la piel puede inducir a quimiocinas proinflamatorias tales como TARC y MDC, la IL-31 puede estar implicada en la patofisiología de la dermatitis por contacto. Utilizando un anticuerpo neutralizante de IL-31 en un modelo de ratón de hipersensibilidad por contacto.

Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento, puede utilizarse para mejorar el resultado clínico de la Hipersensibilidad por Contacto mediante la inhibición, reducción, neutralización, prevención o el bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociados con la enfermedad.

Dermatitis atópica

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónicamente de forma crónica, con una incidencia espectacularmente creciente a lo largo de las últimas décadas. Clínicamente, la DA se caracteriza por placas altamente pruriginosas con frecuencia excoriadas y pápulas que muestran un curso recidivante crónico. El diagnóstico de la DA es principalmente a base de signos clínicos graves y leves. Véase Hanifin J.M., Arch Dermatolog. 135, 1511 (1999). La histopatología revela espongiosis, híper paraqueratosis y paraqueratosis focal en las lesiones agudas, mientras que la hiperplasia epidérmica pronunciada con híper y paraqueratosis, la acantosis/híper granulosis y la infiltración perivascular de la dermis con linfocitos y abundantes mastocitos son las características distintivas de las lesiones crónicas.

Los linfocitos T desempeñan un papel central en el inicio de las respuestas inmunitarias locales en los tejidos y la evidencia sugiere que los linfocitos T que infiltran la piel, en particular, pueden desempeñar un papel clave en el inicio y el mantenimiento de las respuestas inmunitarias desreguladas en la piel. Aproximadamente el 90 % de los linfocitos T infiltrantes de los sitios inflamatorios cutáneos expresan el Ag (CLA+) asociado a linfocitos cutáneos que se une a E-selectina, una molécula de adhesión inducible en el endotelio (revisado en Santamaría-Babi L.F., y col., Eur J Dermatol: 14, 13, (2004)). En los pacientes de DA se ha documentado un aumento significativo de los linfocitos T CLA+ circulantes en comparación con individuos de control (véase Teraki Y., y col., Br J Dermatol. 143, 373 (2000)), aunque otros han demostrado que los linfocitos T CLA+ de memoria de pacientes con DA responden de forma preferente al extracto de alérgeno en comparación con la población CLA- (véase Santamaría-Babi, L.F., y col., J Exp Med:181, 1935, (1995)). En seres humanos, la patogenia de los trastornos atópicos de la piel se ha asociado con aumentos de los linfocitos T CLA+ que expresan niveles aumentados de citocinas tipo Th-2 como IL-5 e IL-13 9, 10. Véase Akdis M., y col., Eur J Immunol: 30, 3533 (2000); y Hamid Q., y col., J Allergy Clin Immunol: 98, 225 (1996).

Los ratones NC/Nga desarrollan de forma espontánea lesiones similares a la DA que se asemejan en muchos aspectos a la DA del ser humano, incluyendo la evolución y los signos clínicos, la histopatología y la inmunopatología, cuando se los emplaza en condiciones no libre de patógenos específicos (no LPE) a alrededor de las 6-8 semanas de edad. Por el contrario, los ratones NC/Nga mantenidos en condiciones LPE no desarrollan lesiones cutáneas. Sin embargo, la aparición de lesiones cutáneas espontáneas y el comportamiento de rascado se pueden sincronizar en ratones NC/Nga emplazados en una instalación LPE mediante la inyección semanal intradérmica de antígeno de ácaro del polvo crudo. Véase Matsuoka H., y col., Allergy: 58, 139 (2003). Por lo tanto, el desarrollo de DA en NC/Nga es un modelo útil para la evaluación de productos terapéuticos nuevos para el tratamiento de la DA.

Además del modelo NC/Nga de DA espontánea, también puede utilizarse la sensibilización epicutánea de ratones utilizando OVA como un modelo para inducir el engrosamiento epidérmico y dérmico dependiente de antígeno con un infiltrado mononuclear en la piel de los ratones sensibilizados. Normalmente, esto coincide con niveles elevados en suero de la IgE total y específica sin embargo, normalmente no se produce en este modelo la disfunción de la barrera de la piel o prurito. Véase Spergel J.M., y col., J Clin Invest, 101: 1614, (1998). Este protocolo se puede modificar para inducir la desregulación de la barrera de la piel y el prurito mediante la sensibilización de ratones transgénico DO11.10 OVA TCR con OVA. Aumentar el número de linfocitos T específicos de antígeno que podrían

reconocer al antígeno sensibilizador puede aumentar el nivel de la inflamación en la piel para inducir comportamiento de rascado visible y la liquenificación/descamación de la piel.

5 El modelo de DA espontánea NC/Nga y el modelo DO11.10 epicutáneo OVA se utilizan para evaluar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento para inhibir, reducir o neutralizar los efectos de la IL-31. La administración de moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados puede dar como resultado la reducción del rascado, que puede ser efectiva en el tratamiento de las enfermedades pruriginosas que incluyen, pero sin limitación, dermatitis atópica, prurigo nodular y eccema, debido a que el cese del rascado detendrá la evolución de la dermatitis, cuyo desarrollo es dependiente del rascado.

10 Los modelos adicionales para medir los efectos inhibidores de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento se describen en Umeuchi, H. y col., *European Journal of Pharmacology*, 518: 133-139, 2005; y en Yoo, J. y col., *J. Experimental Medicine*, 202:541-549, 2005.

15 Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento puede utilizarse para mejorar las consecuencias clínicas de la dermatitis y de enfermedades pruriginosas que incluyen dermatitis atópica, prurigo nodular, y eccema, mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociados con la enfermedad.

Los procedimientos de medición de la capacidad de los anticuerpos y antagonistas anti IL-31 humanizados para inhibir, reducir, o neutralizar la respuesta de picor, incluyen los siguientes ensayos y modelos:

20 I) Tratamiento de capsaicina de ratones tratados con IL-31

Animales BALB/c (CRL) de diez semanas se anestesian e inyectan con un agente analgésico de larga duración, clorhidrato de bupranorfina por vía subcutánea a 0,1 mg/kg, antes de la inyección de 0,25 ml de solución de capsaicina 4 mg/ml en etanol al 10 % + Tween-80 al 10 % en solución salina por vía subcutánea en la nuca. Los animales se mantuvieron anestesiados durante por lo menos 30 min después del tratamiento con neurotoxina.

25 Cuarenta y ocho horas más tarde se implantaron por vía subcutánea bombas osmóticas de 14 días para la entrega continua de IL-31 20 µg/día durante 14 días. Se controló de forma diaria durante 6 días la alopecia y el prurito en los ratones, utilizando el siguiente criterio: 0 = sin rascado, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del pelaje en áreas pequeñas, rascado observado, 2 = pérdida de pelo leve (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida de pelo moderada, rascado y 4 = pérdida de pelo grave, rascado excesivo.

30 La neutralización, inhibición o reducción de la IL-31 mediante moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados puede disminuir la incidencia y la intensidad del picor, y por lo tanto de la dermatitis, en pacientes que padecen trastornos de la piel que implican picor.

II) Expresión del gen Tac1

Los ratones que son homocigotos nulos para el gen Tac1 no expresan sustancia P o neuroquinina A perceptible.

35 Estos ratones tienen respuestas al dolor nociceptivo a estímulos moderados a intensos reducidas de forma significativa y son por lo tanto una herramienta útil para el estudio de la contribución de los péptidos taquiquinina al procesamiento del dolor/picor y a las patologías inflamatorias. Se implantaron bombas osmóticas de 14 días que entregaban 1 µg/día de proteína IL-31 ratones genosuprimidos para Tac1 de doce semanas y se observó de forma diaria la alopecia y el prurito utilizando el siguiente criterio: 0 = no rascado, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del pelaje en áreas pequeñas, rascado observado, 2 = pérdida de pelo leve (parches pequeños), rascado, 3 = pérdida de pelo moderada, rascado, y 4 = pérdida de pelo grave, rascado excesivo.

45 Los resultados de este estudio muestran que los ratones deficientes en Tac1 fueron menos susceptibles al rascado/pérdida de pelo inducido mediante la IL-31 en comparación con los ratones de control de tipo silvestre. Aunque el 100 % (10/10) de los ratones de tipo silvestre habían desarrollado evidencia de rascado y pérdida de pelo hacia el día 6 del tratamiento con la IL-31, solamente el 33,3 % (2/6) de los ratones deficientes en Tac1 mostraron signos de rascado y de pérdida de pelo en el mismo punto de tiempo. Por lo tanto, la neutralización, inhibición o reducción de la IL-31 mediante moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados puede disminuir la incidencia y la intensidad del rascado en el contexto de dermatitis.

III) Administración de anticuerpos neutralizantes de la IL-31

50 Ratones BALB/c (CRL) hembra normales de aproximadamente 8 a 12 semanas se pueden implantar por vía subcutánea con bombas osmóticas de 14 días (Alzet, n.º 2002) que entregan IL-31m 1 µg/día. Los grupos de ratones reciben inyecciones intraperitoneales (i.p.) de anticuerpo monoclonal de rata anti IL-31 de ratón 10 mg/kg (200 µg/ratón) dos veces a la semana, comenzando 1 semana antes de la entrega de IL-31. Los grupos de ratones de control reciben inyecciones i.p. de vehículo (PBS/BSA al 0,1 %) con programas de dosificación idénticos. Se valora diariamente la alopecia y el prurito en los ratones utilizando el siguiente criterio: 0 = sin rascado, el animal parece normal, 1 = adelgazamiento del pelaje en áreas pequeñas, rascado observado, 2 = pérdida de pelo leve (parches

pequeños), rascado, 3 = pérdida de pelo moderada, rascado, y 4 = pérdida de pelo grave, rascado excesivo.

Por lo tanto, la neutralización, reducción o inhibición de la IL-31 mediante moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 puede retrasar la aparición de la respuesta de rascado/pérdida de pelo inducida mediante la IL-31.

- 5 Los efectos de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados se miden mediante la inhibición del rascado, picor, dermatitis, una reducción de la expresión del IL-31RA en queratinocitos, y/o una reducción en el valor para la alopecia y el prurito.

#### Reacciones alérgicas cutáneas de tipo retrasado inducidas por fármacos

- 10 Las reacciones alérgicas cutáneas de tipo retrasado inducidas por fármaco son muy heterogéneas y pueden reflejar muchos sucesos patofisiológicos distintos. Véase Brockow K., y col., *Allergy*: 57, 45 (2002). Los mecanismos inmunitarios implicados en estas acciones se han mostrado como mediados por anticuerpos o células. En la alergia a fármaco inmediata se puede demostrar una reacción de anticuerpos mediada por IgE mediante pruebas de punción cutánea y/o intradérmica positivas después de 20 min, mientras que las reacciones no inmediatas a fármacos pueden producirse más de una hora después de la última entrada de fármaco, y a menudo están
- 15 mediadas por linfocitos T. Las reacciones de tipo retardada mediadas por linfocitos T no inmediatas pueden producirse en pacientes con reacciones adversas a fármacos a por ejemplo penicilinas. Las respuestas de linfocitos T proliferativos a las penicilinas han mostrado estar restringidas a la subpoblación de linfocitos T (CD45RO+) CLA+ de memoria de pacientes alérgicos a la penicilina, mientras que el subconjunto CD45RO+ CLA- no muestra respuesta proliferativa. Véase Blanca M., Leyva L., y col., *Blood Cells Mol Dis*: 31, 75 (2003). Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) pueden reproducirse de forma artificial en ratones, permitiendo la
- 20 evaluación de los factores que pueden estar implicados en el inicio y la continuación de la respuesta HTR. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados podrían ser eficaces en la limitación, la reducción, la inhibición de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

- 25 La necrólisis epidérmica tóxica (NET) es una reacción a fármacos muy rara pero extremadamente severa, que se caracteriza por la apoptosis generalizada de la epidermis con ampollas extensas. Los estudios han mostrado que los linfocitos que filtran la ampolla son linfocitos T CLA+ y pueden mostrar citotoxicidad contra los queratinocitos epidérmicos. Véase, Leyva L., y col.; *J Allergy Clin Immunol*: 105, 157 (2000); y Nassif A., Bensussan A., y col., *J Allergy Clin Immunol*: 114, 1209 (2004). Para establecer un modelo animal para la NET se ha generado un sistema de ratón transgénico mediante el cual se expresa OVA bajo el control del promotor de la queratina 5 (K5) en
- 30 queratinocitos foliculares epidérmicos y del pelo de ratones. Cuando se transfieren de forma adoptiva linfocitos T CD8+ específicos de OVA a ratones K5-OVA, experimentan activación y proliferación en los nódulos linfáticos de drenaje cutáneos 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 NET. Véase, Azukizawa H., y col., *Eur J Immunol*. 33, 1879 (2003).

- 35 Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento puede utilizarse para mejorar las consecuencias clínicas de la NET mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociado con la enfermedad.

#### Pénfigo vesicular

- 40 El pénfigo vesicular es un trastorno subepidérmico que se manifiesta como 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 dermoepidérmica. Véase, Jordon R.E., y col., *JAMA*: 200, 751 (1967). Los estudios que analizan el papel de los linfocitos T en la patogenia del pénfigo vesicular mediante el análisis de LSP y linfocitos T de ampollas cutáneas han encontrado una
- 45 predominancia de linfocitos T CLA+ que expresan niveles aumentados de citocinas de Th2 como IL-4 e IL-13. Véase Teraki Y., y col., *J Invest Dermatol*. 117, 1097 (2001). En los pacientes de pénfigo vesicular después de la terapia con corticosteroides sistémicos, la frecuencia de las células CLA+ que producen interleucina-13, pero no la de las CLA-, disminuye de forma significativa. La disminución de las células CLA+ después del tratamiento con corticosteroides se asocia con la mejora clínica. Véase Teraki, citado en el presente documento.

- 50 Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento se puede utilizar para mejorar las consecuencias clínicas del pénfigo vesicular mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociado con la enfermedad.

#### Alopecia areata

- 55 La alopecia areata (AA) se considera como una enfermedad autoinmunitaria restringida al tejido de los folículos pilosos, en los que la actividad folicular se detiene debido a la actividad continuada de los infiltrados linfocíticos. La AA da como resultado parches de pérdida completa de pelo en cualquier lugar del cuerpo, si bien no se produce pérdida real de folículos pilosos, incluso en las lesiones sin pelo. A pesar de que están ausentes los signos clínicos

de inflamación, las biopsias cutáneas de los sitios con enfermedad activa muestran inflamación linfocítica perifolicular principalmente de células CD4+, junto con un infiltrado intrafolicular de CD8+. Véase Kalish R.S. & Gilhar A. J Investig Dermatol Symp Proc: 8, 164 (2003).

5 Los estudios han mostrado que los linfocitos CD4+ o CD8+ que infiltran la piel del cuero cabelludo expresan CLA y que, en sangre periférica de los individuos con AA, el porcentaje de linfocitos CLA+ o CD8+ CD4+ es significativamente mayor que el de los controles normales. Además, los pacientes con AA grave o progresiva muestran una positividad para CLA mucho mayor en comparación con los pacientes que se están recuperando de la enfermedad, y una disminución del porcentaje de células CLA+ positivas paraleliza una evolución clínica buena. Véase, Yano S., y col., Acta Derm Venereol: 82, 82 (2002). Por lo tanto, estos estudios sugieren que los linfocitos CLA+ pueden desempeñar un papel importante en la AA. Los modelos de xenoinjerto han demostrado que es probable que los linfocitos T activados desempeñen un papel en la patogenia de la AA. En cuero cabelludo lesional de pacientes de AA injertado en ratones desnudos recrece el pelo, en coincidencia con una pérdida de linfocitos infiltrantes del injerto y, la transferencia de linfocitos T lesionales activados a ratones SCID puede transferir la pérdida de lo pelo a explantes de cuero cabelludo de ser humano en ratones SCID. Véase Kalish R.S. & Gilhar A. J Investig Dermatol Symp Proc: 8, 164 (2003).

20 Son parte del tratamiento habitual de este trastorno una diversidad de terapias inmunomoduladoras sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha sido consistente en su eficacia. Véase Tang L., y col., J Invest Dermatol: 120, 400 (2003); Tang L., y col., (2004); y Tang L., y col., J Am Acad Dermatol: 49, 1013 (2003). Sin embargo, su uso en modelos animales válidos proporciona una herramienta para diseccionar los mecanismos moleculares de los efectos terapéuticos. Véase Shapiro J., y col., J Investig Dermatol Symp Proc: 4, 239 (1999); Tang L., y col., Old wine in new bottles: reviving old therapies for alopecia areata using rodent models (2003); y Verma D.D., y col., Eur J Dermatol: 14, 332 (2004).

25 Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento se puede utilizar para mejorar las consecuencias clínicas de la alopecia areata mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociados con la enfermedad.

#### Acné Rosacea/Acné vulgaris

30 El acné vulgaris, un trastorno del aparato pilosebáceo, es el problema cutáneo más común en la adolescencia. Se piensa que las anomalías en la queratinización folicular producen la lesión del acné. El acné rosácea se diferencia del acné vulgaris por la presencia de pápulas rojas, pústulas, quistes y telangiectasias extensas, y la ausencia de comedones (espinillas). La producción aumentada de sebo en las glándulas sebáceas es un factor principal en la patofisiología del acné vulgaris. Otras funciones de las glándulas sebáceas también están asociadas con el desarrollo del acné, que incluye lípidos proinflamatorios sebáceos; distintas citocinas producidas de forma local; péptidos y neuropéptidos periglandulares, tales como la hormona liberadora de corticotrofina que producen los sebocitos; y la sustancia P, que se expresa en las terminaciones nerviosas en las inmediaciones de glándulas con aspecto saludable de los pacientes de acné. Véase, Zouboulis C.C. Clin Dermatol. 22, 360 (2004).

40 Aunque la patofisiología del acné vulgaris y del acné rosácea todavía es desconocida, las observaciones clínicas y los estudios histopatológicos sugieren que la inflamación del folículo pilosebáceo puede ser importante para la patogenia del rosácea y del acné vulgaris. Los primeros estudios de análisis de los subconjuntos de linfocitos T que infiltran las lesiones de rosácea indicaron que la mayoría de los linfocitos expresaban CD4. Véase Rufli T. & Buchner S.A. Dermatologica: 169, 1 (1984).

45 Los linfocitos T CD4+ positivos producen IL-31 y el análisis de IHQ de la piel para la expresión de IL-31 sugiere que la IL-31 se expresa en las glándulas sebáceas y sudoríparas. La estimulación de la IL-31 de los queratinocitos epidérmicos induce la expresión de quimiocinas lo que probablemente da como resultado la infiltración celular, lo que sugiere que la IL-31 puede contribuir a la respuesta proinflamatoria en la piel. Véase, Dillon S.R., y col., Nat Immunol: 5, 752 (2004). Por lo tanto, la IL-31 puede contribuir a la patofisiología del acné rosácea y del acné vulgaris.

50 Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento puede utilizarse para mejorar el resultado clínico del acné vulgaris mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociados con la enfermedad.

#### Prurigo nodular

55 El prurigo nodular es una erupción de nódulos liquenificados o excoriados provocados por prurito resistente que es difícil de tratar. Aunque el frotamiento crónico da como resultado liquenificación y el rascado en excoriaciones lineales, en individuos que tocan y hurgan sus picores, la piel irritada tiende a producir pápulas marcadamente engrosadas conocidas como nódulos de prurigo. Aunque el prurigo nodular no es específico de la dermatitis atópica, muchos pacientes con estos nódulos tienen también una reacción atópica, que se manifiesta como rinitis alérgica, asma, o alergia alimentaria. Los linfocitos T representan la mayoría de las células infiltrantes en las lesiones del

prurigo, y estas lesiones a menudo representan las lesiones cutáneas más pruriginosas en los pacientes atópicos.

El tratamiento tópico del prurigo nodular con capsaicina, un alcaloide antipruriginoso que interfiere con la percepción de los pruritos y del dolor mediante el empobrecimiento de neuropéptidos como la sustancia P en los nervios cutáneos sensoriales pequeños, ha probado ser un régimen eficaz y seguro que da como resultado la eliminación de las lesiones cutáneas. Véase, Stander S., y col., J Am Acad Dermatol. 44, 471 (2001). Los estudios de la respuesta de picor en los ratones NC/Nga utilizando el tratamiento de capsaicina mostraron que se prevenía de forma casi completa el desarrollo espontáneo de las lesiones de dermatitis. Además, la elevación de los niveles en suero de la IgE se suprimió de forma significativa y se redujo la cantidad de eosinófilos y mastocitos infiltrantes en la piel lesional de los ratones tratados con capsaicina. Véase Mihara K., y col., 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 potenciación de diversas respuestas inmunitarias, lo que implica por lo tanto que la prevención de la sensación de picor y/o el comportamiento de rascado asociado al picor podría ser un tratamiento eficaz para la DA. Véase Mihara K., y col., Br J Dermatol: 151, 335 (2004). Por lo tanto, los anticuerpos anti IL-31 humanizados descritos en el presente documento serán útiles en la minimización de los efectos de la DA, del prurigo nodular, y de otras enfermedades pruriginosas, dado que en el presente documento han mostrado reducir la cantidad de rascado en los ratones NC/Nga.

La entrega crónica de la IL-31 induce prurito y la alopecia en ratones, seguido del desarrollo de lesiones cutáneas que se asemejan a la dermatitis, lo que sugiere que la IL-31 puede inducir picor. Véase Dillon S.R., y col., Nat Immunol: 5, 752 (2004). La implicación de la IL-31 en la inducción de la respuesta de picor se puede medir, por ejemplo, mediante dos procedimientos (i) el tratamiento con capsaicina de ratones tratados con IL-31; y (ii) el tratamiento con IL-31 de ratones genosuprimidos Tac1, lo que ha reducido de forma significativa las respuestas al dolor nociceptivo debido a la pérdida de expresión de neuropéptidos. Además, puede probarse en estos modelos si la neutralización de la IL-31 en los ratones tratados con IL-31 con las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados pudiese prevenir el prurito y la alopecia.

Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados descritos en el presente documento se puede utilizar para mejorar las consecuencias clínicas del prurigo nodular mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociado con la enfermedad.

Virus con tropismo cutáneo y prurito asociado con virus

Linfocitos T CD8+ específicos para el Virus Herpes Simple (VHS) en sangre periférica y los linfocitos T CD8+ específicos de VHS recuperados de lesiones de herpes expresan altos niveles de CLA, mientras que los linfocitos T CD8+ específicos de virus herpes sin tropismo cutáneo carecen de expresión de CLA. Véase Koelle D.M., y col., J Clin Invest: 110, 537 (2002). Los linfocitos T CD4+ reactivos a VHS-2 también expresan CLA, pero en niveles menores que los observados anteriormente para los linfocitos T CD8+. Véase González J.C., y col., J Infect Dis: 191, 243 (2005). También se ha asociado al prurito con infecciones por virus herpes (véase, Hung K.Y., y col., Blood Purif: 16, 147 (1998)). Si bien también otras enfermedades virales, como el VIH, se han asociado con lesiones cutáneas pruriginosas. El prurito grave, que no responde al tratamiento, a menudo asociado con lesiones cutáneas eritematopapulares e hipereosinofilia, es una afección observada en algunos pacientes infectados con VIH no atópicos. Véase Singh F. & Rudikoff D, Am J Clin Dermatol; 4, 177 (2003); y Milazzo F., Piconi S., y col., Allergy: 54, 266 (1999).

La asociación de virus con tropismo cutáneo con el prurito y con linfocitos T CLA+ sugiere que los linfocitos T que producen IL-31 pueden estar implicados en la patofisiología de las infecciones virales.

Por lo tanto, la neutralización de la IL-31 mediante las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados descritas en el presente documento puede utilizarse para mejorar las consecuencias clínicas del prurito asociado con los virus con tropismo cutáneo, mediante la inhibición, reducción, prevención o bloqueo de la inflamación y/o el rascado asociados con la enfermedad.

Además, la inflamación es una respuesta protectora de un organismo para defenderse de un agente invasor. La inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de las respuestas inflamatorias puede dejar a un hospedador inmunocomprometido; sin embargo, si se deja descontrolada, la inflamación puede conducir a complicaciones serias que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y similares), shock septicémico e insuficiencia multiorgánica. Notablemente, estas patologías diversas comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad y la mortalidad del ser humano. Por lo tanto, está claro que los anticuerpos antiinflamatorios y los polipéptidos de unión, tales como los anticuerpos y polipéptidos de unión anti IL-31 descritos en el presente documento podrían tener un potencial terapéutico de gran importancia para un vasto número de enfermedades del ser humano y de animales, desde asma y alergia hasta autoinmunidad y shock septicémico. Como tal, el uso de anticuerpos y polipéptidos de unión anti IL-31 antiinflamatorios descritos en el presente documento se puede utilizar de forma terapéutica como los antagonistas de la IL-31 descritos en el presente documento, en particular en



enfermedades tales como artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, enfermedades relacionadas y similares.

### 1. Artritis

5 La artritis, que incluye osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de lesión, y similares, son afecciones inflamatorias comunes que podrían beneficiarse del uso terapéutico de los anticuerpos y de los polipéptidos de unión antiinflamatorios, tales como los anticuerpos y polipéptidos de unión anti IL-31 de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que recubre la articulación, lo que provoca dolor, agarrotamiento, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como consecuencia de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamado, la membrana sinovial, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago, lo que conduce al deterioro de la articulación y a dolor grave, entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su formar y alineamiento, lo que da como resultado dolor y pérdida de movimiento.

15 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inmunomediada que se caracteriza, de forma particular, por inflamación y daño tisular posterior, lo que conduce a incapacidad grave y mortalidad aumentada. En las articulaciones reumatoideas se produce de forma local una diversidad de citocinas. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas proinflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores del TNF-alfa y de la IL-1 en pacientes con ARN ha conducido a una mejora espectacular de los signos clínicos y biológicos de inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión ósea y de destrucción de cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de pacientes no responde a estos agentes, lo que sugiere que también están implicados otros mediadores en la patofisiología de la artritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2): 135-149, 2002). Uno de los mediadores podría ser la IL-31 y como tal, una molécula que se une o inhibe a la IL-31, tal como los anticuerpos anti IL-31 o compañeros de unión, podría servir como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación en la artritis reumatoide, y en otras enfermedades artríticas.

30 Hay varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja estrechamente a la artritis reumatoide del ser humano. Debido a que el AIC comparte características inmunitarias y patológicas similares a la AR, esto lo hace un modelo ideal para la exploración de compuestos antiinflamatorios potenciales para el ser humano. El modelo AIC es un modelo bien conocido en ratones que, para que se produzca, depende de una respuesta inmunitaria y de una respuesta inflamatoria. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de linfocitos B y de linfocitos T CD4+ en respuesta a colágeno, el que se proporciona como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de las respuestas tisulares de los mediadores de inflamación, como consecuencia de algunos de estos anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el colágeno nativo de ratón y que activan la cascada del complemento. Una ventaja del uso del modelo AIC es que el mecanismo básico de patogenia es conocido. Se han identificado en el colágeno de tipo II los epítomos de linfocitos T y de linfocitos B de interés, y se han determinado diversos parámetros inmunitarios (por ejemplo, hipersensibilidad del tipo retardado y anticuerpos anti colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, y enzimas que degradan la matriz) relacionados con la artritis inmunomediada, y pueden así utilizarse en el modelo de AIC para evaluar la eficacia del compuesto de prueba (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams y col., *Immunol.* 89: 9784-788, 1992; Myers y col., *Life Sci.* 61: 1861-78, 1997; y Wang y col., *Immunol.* 92: 8955-959, 1995).

45 Como una molécula que modula la respuesta inmunitaria e inflamatoria, la IL-31 puede inducir la producción de AAS, la cual está implicada en la patogenia de la artritis reumatoide. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados pueden reducir la actividad de la AAS *in vitro* e *in vivo*, la administración sistémica o local de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 puede de forma potencial suprimir la respuesta inflamatoria en la AR.

### 2. Endotoxemia

50 La endotoxemia es una afección grave que se produce normalmente a partir de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedades infecciosas, septicemia, síndrome de choque tóxico o en pacientes inmunocomprometidos sujetos a infecciones oportunistas, y similares. Los anticuerpos y polipéptidos de unión antiinflamatorios terapéuticamente útiles, tales como los anticuerpos anti IL-31 y polipéptidos de unión de la presente invención, podrían ayudar en la prevención y el tratamiento de la endotoxemia en seres humanos y animales. Otros productos terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos IL-31RA, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti IL-31 o compañeros de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (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 utilizado y aceptable para el estudio de los efectos farmacológicos de agentes proinflamatorios o inmunomodulares potenciales. Los LPS, producidos en bacterias gram negativas, es un agente causal principal en la patogenia del choque septicémico (Glausner y col., Lancet 338: 732, 1991). De hecho, en animales se puede inducir de forma experimental un estado similar al choque mediante una única inyección de LPS. Las moléculas que producen las células que responden a LPS pueden dirigirse a los patógenos de forma directa o indirecta. Aunque estas respuestas biológicas protegen al hospedador frente a los patógenos invasores, también pueden provocar daño. Por lo tanto, la estimulación masiva de la inmunidad innata, que se produce como consecuencia de la infección severa por bacterias Gram negativas, conduce a la producción excesiva de citocinas y de otras moléculas, y al desarrollo de un síndrome fatal, el síndrome de choque septicémico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia multiorgánica (Dumitru y col. Cell 103: 1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos del LPS se relacionan principalmente con la activación de macrófagos, que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, el TNF parece desempeñar un papel de gran importancia, como lo indica la prevención de la toxicidad del LPS mediante la administración de anticuerpos neutralizantes anti TNF (Beutler y col., Science 229: 869, 1985). Está bien establecido que la inyección 1 ug de LPS de *E. coli* en un ratón C57B1/6 dará como resultado un aumento significativo de la IL-6, el TNF-alfa, la IL-1 y de proteínas de la fase aguda (por ejemplo, la AAS) circulantes aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad del LPS parece estar mediada mediante estas citocinas dado que la inmunización pasiva frente a estos mediadores puede dar como resultado mortalidad disminuida (Beutler y col., Science 229: 869, 1985). Las estrategias potenciales de inmunointervención para la prevención y/o el tratamiento del shock septicémico incluyen Acm anti TNF, antagonista del receptor de IL-1, LIF, IL-10 y G-CSF. Dado que el LPS induce la producción de factores proinflamatorios posiblemente contribuyendo a la patología de la endotoxemia, la neutralización de la actividad de IL-31, de AAS o de otros factores proinflamatorios mediante la antagonización del polipéptido IL-31 se puede utilizar para reducir los síntomas de la endotoxemia, tal como se ve en el choque endotóxico. Otros productos terapéuticos potenciales incluyen moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados.

### 3. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. EII

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) puede afectar ya sea al colon o al recto (colitis ulcerosa) o a ambos, al intestino delgado y grueso (enfermedad de Crohn). La patogenia de estas enfermedades no es clara, pero implican una inflamación crónica de los tejidos afectados. Los productos terapéuticos potenciales, que incluyen polipéptidos IL-31RA, polipéptidos receptores heterodiméricos y multiméricos solubles, o anticuerpos anti IL-31 o compañeros de unión de la presente invención, y similares, podrían servir como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la EII y en enfermedades relacionadas.

La inflamación crónica y la ulceración en la enfermedad de Crohn normalmente se inicia con la obstrucción del intestino delgado o dolor abdominal, lo que puede imitar a la apendicitis aguda; otras presentaciones pueden relacionarse con sus complicaciones. La evolución de la enfermedad es crónica, y puede haber empeoramientos y remisiones a pesar de la terapia. La aparición normalmente es a principios de la vida adulta, comenzando aproximadamente la mitad de los casos entre los 20 y 30 años y el 90 % entre los 10 y 40 años. Se ven afectadas ligeramente más hombres que mujeres.

La microscopía refleja las apariencias globales. La implicación de la inflamación es discontinua: es focal o desigual. El acopio de linfocitos y de células plasmáticas se encuentra principalmente en la mucosa y la submucosa pero anormalmente afecta a todas las capas (inflamación transmural). La característica microscópica clásica de la enfermedad de Crohn es la presencia de células granulares rodeadas de una "pliegue" de linfocitos. La incidencia de las enfermedades inflamatorias intestinales idiopáticas muestra considerable variación geográfica. Estas enfermedades tienen mucha más incidencia en el norte de Europa y en los Estados Unidos que en países de Europa del sur, África, Sudamérica y Asia, aunque la urbanización y prosperidad crecientes está conduciendo a una mayor incidencia en partes del sur de Europa y Japón (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone, 3ª edición 2000, JCE Underwood, Ed.).

En la enfermedad de Crohn, hay dos grupos clínicamente principales, el primero comprende pacientes cuya enfermedad entra en remisión duradera dentro de los tres años de la aparición, el segundo comprende a pacientes con enfermedad que persiste más allá de los tres años.

Cualquiera será la etiología, en la enfermedad de Crohn hay pruebas de activación de linfocitos T y de macrófagos persistente e inapropiada, con producción aumentada de citocinas proinflamatorias, en particular de interleucinas (IL) 1, 2, 6 y 8, Interferón (IFN) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La enfermedad de Crohn se caracteriza por inflamación sostenida (crónica) acompañada de fibrosis. El proceso de proliferación fibroblástica y de deposición de colágeno puede estar mediado por el factor de crecimiento transformante, el cual tiene determinadas acciones antiinflamatorias, concretamente incorporación de fibroblastos, síntesis de la matriz y regulación negativa de células inflamatorias, pero es más probable que estén implicados muchos otros mediadores.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, denominado comúnmente el colon, caracterizada por la inflamación y la ulceración de la mucosa o del revestimiento más profundo del colon. Esta

inflamación provoca que el colon se vacíe frecuentemente, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen el aflojamiento de la deposición y cólico abdominal asociado, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la CU es desconocida, investigaciones recientes sugieren que las defensas naturales del cuerpo operan frente a las proteínas del cuerpo que el cuerpo piensa que son extrañas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizás debido a que se asemejan a proteínas bacterianas del intestino, estas proteínas pueden incitar o estimular el proceso inflamatorio que comienza a destruir el recubrimiento del colon. A medida que el recubrimiento del colon se destruye, se forman las úlceras que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad habitualmente comienza en el área rectal y puede extenderse de forma eventual 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 enfermedad grave se puede producir muerte del tejido del colon o septicemia. Los síntomas de la colitis ulcerosa varían en gravedad y su aparición puede ser gradual o repentina. Muchos factores pueden provocar los ataques, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

Aunque actualmente no hay cura disponible para la CU, los tratamientos se enfocan en la supresión del proceso inflamatorio anormal en el recubrimiento del colon. Están disponibles para tratar la enfermedad tratamientos que incluyen corticosteroides inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos. Sin embargo, el uso prolongado de inmunosupresores tales como los corticosteroides y la azatioprina puede dar como resultado efectos secundarios serios que incluyen adelgazamiento de los huesos, cataratas, infección, y efectos en el hígado y en la médula ósea. La cirugía es una opción en pacientes en los que las terapias actuales no son satisfactorias. La cirugía implica la extirpación del colon completo y del recto.

Existen varios modelos animales que pueden imitar de forma parcial la colitis ulcerosa crónica. El modelo más ampliamente utilizado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y úlceras en el colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles a través de instilación intrarrectal, induce la respuesta inmunitaria que median linfocitos T en la mucosa del colon, conduciendo en este caso a una inflamación masiva de la mucosa caracterizada por la infiltración densa de linfocitos T y de macrófagos a través de la pared de todo el intestino grueso. Además, esta imagen histopatológica se acompaña de la imagen clínica de pérdida de peso progresiva (debilitamiento), diarrea con sangre, prolapso del recto, y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000).

Otro modelo de colitis utiliza dextrán sulfato de sodio (DSS), que induce una colitis aguda que se manifiesta mediante diarrea con sangre, pérdida de peso, acortamiento del colon y úlceras en la mucosa, con infiltración de neutrófilos. La colitis que induce el DSS se caracteriza histológicamente por la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño focal de las criptas, y úlceras epiteliales. Se piensa que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio y por la fagocitosis de las células de la lámina propia y la producción de TNF-alfa y de IFN-gamma. A pesar de su uso común, varias cuestiones relativas a los mecanismos del DSS sobre la relevancia para la enfermedad humana siguen sin resolverse. El DSS se considera como un modelo independiente de linfocitos T debido a que se observa en animales deficientes en linfocitos T tales como ratones SCID.

La administración de moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas o de antagonistas de la IL-31 a estos modelos de TNBS o de DSS, se puede utilizar para evaluar el uso de los antagonistas de la IL-31 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad gastrointestinal. La IL-31 puede desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria en la colitis, y en la neutralización de la actividad de IL-31 mediante la administración de moléculas de unión al antígeno IL-31 o de antagonistas de la IL-31 humanizados es una estrategia terapéutica potencial para la EII.

#### 4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis se produce cuando crecen de forma anormal células nuevas de la piel, lo que da como resultado parches de piel inflamados, hinchados y escamosos, en donde la piel vieja no se ha desprendido suficientemente rápido. La psoriasis en placas, la forma más común, se caracteriza por parches de piel inflamada ("lesiones") cubiertos con escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a unas pocas placas o implicar áreas de piel discretas a extensas, apareciendo de forma más común en el cuero cabelludo, rodillas, codos y en el tronco. Aunque la psoriasis es altamente visible no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de la enfermedad implica la inflamación crónica de los tejidos afectados. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados podrían servir como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la psoriasis, en otras enfermedades cutáneas inflamatorias, en alergias cutáneas y de las mucosas, y en enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno cutáneo inflamatorio mediado por linfocitos T que puede provocar considerable molestia. Es una enfermedad para la cual no hay cura y que afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente al dos por ciento de la población europea y de América del Norte. Aunque los individuos con psoriasis suave a menudo pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo necesita terapia ultravioleta o inmunosupresora sistémica. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y de las toxicidades de muchas terapias limitan su tratamiento prolongado. Además, los pacientes habitualmente tienen recurrencia de la psoriasis.

La IL-31 se aisló del tejido conocido por tener importante función inmunológica y que contiene células que desempeñan un papel en el sistema inmunitario. La IL-31 se expresa en células de sangre periférica activadas, seleccionadas por CD3+, y se ha demostrado que la expresión de la IL-31 aumenta después de la activación de los linfocitos T. Además, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados pueden tener un efecto sobre el crecimiento/expansión de los monocitos/macrófagos, los linfocitos T, los linfocitos B, los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) y/o sobre el estado diferenciado de monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK o sus células progenitoras. Se conocen en general los factores que estimulan la proliferación de los progenitores hematopoyéticos y activan células maduras, sin embargo, la proliferación y la activación también pueden necesitar factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-7 y el factor Steel (ligando de c-kit) son necesarios para la formación de colonias de progenitores de NK. IL-15 + IL2 en combinación con la IL-7 y el factor Steel fue más eficaz (Mrozek y col., Blood 87: 2632-2640, 1996). Sin embargo, para la proliferación de subconjuntos específicos de linfocitos NK y/o de los progenitores de NK pueden ser necesarias citocinas no identificadas (Robertson et. al., Blood 76: 2451-2438, 1990). De forma similar, la IL-31 puede actuar sola o en concierto o sinergia con otras citocinas para potenciar el crecimiento, la expansión de la proliferación y la modificación de la diferenciación de los monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos B o linfocitos NK.

La presente especificación describe el uso de moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias como la dermatitis atópica, las enfermedades pruriginosas, la pancreatitis, la diabetes tipo I (DMI), el cáncer de páncreas, la pancreatitis, la enfermedad de Graves, la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), la enfermedad de Crohn, el cáncer de colon y de intestino, la diverticulosis, la enfermedad autoinmunitaria, la septicemia, el trasplante de órganos o de médula ósea; la inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; la amiloidosis; la esplenomegalia; la enfermedad del injerto contra el hospedador; y en la inhibición de la inflamación, la supresión inmunitaria, la reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (que incluyen linfocitos Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), la supresión de la respuesta inmunitaria hacia un patógeno o antígeno. Además, la presencia de la expresión del IL-31RA en células inmunitarias activadas tales como células CD4+y CD19+ activadas mostró que el receptor IL-31RA puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunitarias del cuerpo frente a invasores extraños tales como microorganismos y residuos celulares, y podría desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y la formación de cáncer. Como tal, los anticuerpos y compañeros de unión de la presente invención que son agonistas o antagonistas para la función del receptor IL-31RA, tal como la IL-31, pueden utilizarse para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados pueden también utilizarse dentro de sistemas diagnósticos para la detección de los niveles circulantes de la IL-31. Dentro de una realización relacionada, los anticuerpos u otros agentes que se unen de forma específica a los polipéptidos IL-31 se pueden utilizar para detectar polipéptidos IL-31 circulantes. Los niveles elevados o deprimidos de los polipéptidos ligando pueden ser indicativos de afecciones patológicas, que incluyen el cáncer. Los polipéptidos IL-31 pueden contribuir a los procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente.

En las lesiones ateroscleróticas, una de las primeras anomalías es la localización de monocitos/macrófagos en las células endoteliales. Estas lesiones podrían prevenirse mediante el uso de antagonistas para IL-31. Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden utilizar como antagonistas de la IL-31 en lesiones ateroscleróticas. Además, la leucemia monoblástica está asociada con una diversidad de anomalías clínicas que reflejan la liberación de los productos biológicos de los macrófagos, los ejemplos incluyen altos niveles de lisozima en el suero y en la orina, y fiebre alta. Además, tales leucemias muestran un aumento anormal de células monocíticas. Posiblemente estos efectos podrían prevenirse mediante antagonistas para IL-31, tales como los descritos en el presente documento. Además, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados se pueden conjugar con moléculas tales como residuos tóxicos y citocinas, como se describe en el presente documento para dirigir la destrucción de las células monocíticas de la leucemia.

La IL-31 ha mostrado expresarse en células mononucleares activadas, y puede estar implicadas en la regulación de la inflamación. Como tal, puede ensayarse y utilizarse la capacidad de los polipéptidos de la presente invención para modificar la inflamación, o se pueden utilizar como un marcador de inflamación. Los procedimientos para determinar las calidades proinflamatorias y antiinflamatorias de la IL-31 son conocidos en la técnica y se discuten en el presente documento. Además, puede estar implicada en la regulación positiva de la producción de los reactantes de la fase aguda, tales como el amiloide A sérico (AAS), la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina y la haptoglobina, y la expresión del ligando del receptor IL-31RA puede estar aumentada después de la inyección de lipopolisacárido (LPS) *in vivo*, que está implicado en la respuesta inflamatoria (Dumoutier, L. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). La producción de proteínas de la fase aguda, tales como la AAS, se considera como un mecanismo de supervivencia a corto plazo en donde la inflamación es beneficiosa; sin embargo, el mantenimiento de las proteínas de la fase aguda durante periodos más largos contribuye a la inflamación crónica y puede ser dañino para la salud humana. Para 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 la fase aguda AAS está implicada en la patogenia de diversas enfermedades inflamatorias crónicas, está implicada en la aterosclerosis y la artritis reumatoide, y es

precursora de la proteína amiloide A depositada en la amiloidosis (Uhlar, CM y Whitehead, citado anteriormente). Por lo tanto, en donde un ligando tal como la IL-31 actúa como una molécula proinflamatoria e induce la producción de AAS, las moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas o antagonistas de IL-31 serían útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria y de otras enfermedades asociadas con las proteínas de respuesta de fase aguda inducidas por el ligando. Por ejemplo, un procedimiento para la reducción de la inflamación comprende la administración a un mamífero con inflamación o picor, de una cantidad de una composición de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de IL-31 humanizados que sea suficiente para reducir la inflamación o el picor. Además, un procedimiento de supresión de una respuesta inflamatoria en un mamífero con inflamación puede comprender: (1) determinar un nivel de proteína amiloide A sérica; (2) administrar una composición que comprende moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de IL-31 humanizados como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéutico aceptable (3) determinar un nivel de postadministración de proteína amiloide A sérica; (4) comparar el nivel de la proteína amiloide A sérica de la etapa (1) con el nivel de la proteína amiloide A sérica de la etapa (3), en el que una pérdida de aumento o una disminución del nivel de proteína amiloide A sérica es indicativo de supresión de una respuesta inflamatoria.

La distribución tisular del ARNm que corresponden con su ADNc del receptor IL-31RA mostró que los niveles de ARNm fue mayor en monocitos y en células de la próstata, y es elevado en monocitos activados, y células CD4+ activadas, CD8+ activadas, y CD3+ activadas. Por lo tanto, el receptor IL-31RA también está implicado en la inducción de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Por lo tanto, la presente divulgación describe el uso de moléculas de unión al antígeno IL-31 o de antagonistas de la IL-31 humanizados en enfermedades y afecciones inflamatorias e inmunitarias tales como la pancreatitis, la diabetes tipo I (DMI), el cáncer de páncreas, la pancreatitis, la enfermedad de Graves, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la enfermedad de Crohn, el cáncer de colon y de intestino, la diverticulosis, la enfermedad autoinmunitaria, la septicemia, el trasplante de órganos o de médula ósea; la inflamación debida a traumatismo, cirugía o infección; la amiloidosis; la esplenomegalia; la enfermedad del injerto contra el hospedador; y en la inhibición de la inflamación, la supresión inmunitaria, la reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (que incluyen linfocitos Th1 y Th2, células CD4+ y CD8+), la supresión de la respuesta inmunitaria hacia un patógeno o antígeno. Además, la presencia del receptor IL-31RA y la expresión de la IL-31 en células inmunitarias activadas tales como células CD3+ activadas, monocitos, células CD4+ y CD19+, mostró que el receptor IL-31RA puede estar implicado en las reacciones defensivas inmunitarias del cuerpo frente a invasores extraños tal como microorganismos y residuos celulares, y podrían desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias durante la inflamación y la formación de cáncer. Como tal, las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de IL-31 humanizados de la presente invención, que son agonistas o antagonistas para la función del receptor IL-31RA, se pueden utilizar para modificar la respuesta inmunitaria y la inflamación.

Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados son útiles para:

- 1) Antagonizar o bloquear la señalización a través de los receptores que comprenden IL-31RA en el tratamiento de la inflamación aguda, la inflamación como resultado de un traumatismo, lesión tisular, cirugía, septicemia o infección, y de enfermedades inflamatorias crónicas tales como el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la colitis crónica, la esplenomegalia, la artritis reumatoide, los episodios inflamatorios agudos recurrentes (por ejemplo, la tuberculosis), y el tratamiento de la amiloidosis, y la aterosclerosis, la enfermedad de Castleman, el asma y otras enfermedades asociadas con la inducción de la respuesta de la fase aguda; y
- 2) Antagonizar o bloquear la señalización a través del receptor IL-31RA en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la DMI, la esclerosis múltiple (EM), el lupus eritematoso sistémico (LES), la miastenia gravis, la artritis reumatoide, y la EII, para evitar o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos, monocitos, leucocitos) a través del receptor IL-31RA (Hughes C y col., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Como alternativa, para tratar la enfermedad autoinmunitaria también se pueden utilizar anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales (Acm) para IL-31, como un antagonista para empobrecer células inmunitarias no deseadas. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas se pueden tratar con un Acm frente a, por ejemplo, anticuerpos anti IL-31, receptores solubles del receptor IL-31RA soluble o heterodímeros IL-31RA/CRF2-4, para inhibir la respuesta inmunitaria o para empobrecer las células agresoras. El bloqueo o la inhibición de la señalización a través de IL-31RA, utilizando los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, puede también beneficiar a enfermedades del páncreas, riñón, hipófisis y células neuronales. Se pueden beneficiar la DMI, la DMNID, la pancreatitis y el carcinoma de páncreas. El IL-31RA puede servir como una diana para la terapia de Acm del cáncer, en donde un Acm antagonizante inhibe el crecimiento del cáncer y direcciona la destrucción inmunomediada. (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Los Acm para los monómeros, homodímeros, heterodímeros y multímeros del receptor IL-31RA soluble también pueden ser útiles para tratar nefropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), arterioesclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción del riñón asociada con LES, DMI, diabetes tipo II (DMNID), tumores de riñón y otras enfermedades.

En general, la dosificación de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o los antagonistas de la IL-31 humanizados administrados variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, género, estado médico general e historia médica previa del paciente. Normalmente, es conveniente proporcionar al destinatario una dosificación del polipéptido 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 puede administrarse una dosificación menor o mayor si las circunstancias lo determinan. Utilizando procedimientos conocidos en la técnica un experto en la materia puede determinar fácilmente tales dosificados y los ajustes de ellas.

5 La administración a un sujeto de moléculas de unión al antígeno IL-31 o de antagonistas de la IL-31 humanizados puede ser tópica, inhalada, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional, o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administren proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante bolos únicos o múltiples.

10 Las vías adicionales de administración incluyen la oral, en la membrana de las mucosas, pulmonar, y transcutánea. La entrega oral es adecuada para las microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas de proteinoide, 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 and Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una entrega intranasal se ejemplifica por un modo tal como la administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe e Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 199 (1999)). Se pueden preparar e inhalar partículas secas o líquidas que comprenden la IL-31 con la ayuda de dispersadores de polvo seco, generadores de aerosoles líquidos, o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16: 343 (1998); Patton y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 235 (1999)). Esta estrategia se ilustra mediante el sistema de tratamiento de la diabetes AERX, el cual es un inhalador electrónico portátil que entrega insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han demostrado que con ayuda de ultrasonido de baja frecuencia se han entregado a través de la piel proteínas tan grandes como 48.000 kDa en concentraciones terapéuticas, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri y col., *Science* 269: 850 (1995)). La entrega transdérmica utilizando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tenga actividad de unión a la IL-31 (Potts y col., *Pharm. Biotechnol.* 10: 213 (1997)).

25 Se puede formular una composición farmacéutica que comprenda moléculas de unión al antígeno IL-31 o antagonistas de la IL-31 humanizados que tenga una actividad de unión a la IL-31, de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales se combinan las proteínas terapéuticas en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si un paciente receptor puede tolerar su administración. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995).

35 Para fines de terapia, las moléculas que tienen actividad de unión a la IL-31 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una combinación de una proteína, polipéptido, o péptido que tiene actividad de unión a la IL-31 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se dice que 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 utilizado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia por lo menos una parte de la respuesta inflamatoria.

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

50 Las moléculas de unión al antígeno IL-31 o de antagonistas de la IL-31 humanizados desvelados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen al anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y las Patentes de Estados Unidos n.º 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la Patente de Estados Unidos n.º 5.013.556.

55 Los liposomas proporcionan un medio para entregar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración por vía oral, inhalación, o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas de lípidos que rodean compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 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)). Los liposomas son

60

similares en composición a las membranas celulares y como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y pueden variar en tamaño con diámetros variando entre 0,02  $\mu\text{m}$  hasta más de 10  $\mu\text{m}$ . Se puede encapsular en liposomas una diversidad de agentes: distribución de agentes hidrófobos en las bicapas y distribución de agentes hidrófilos dentro de los espacios acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *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, la composición de lípidos, así como la carga y las características de la superficie de los liposomas.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos 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. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin y col. *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) a través de reacción de intercambio de disulfuro. De forma opcional, está contenido dentro del liposoma un agente quimioterapéutico (tal como la Doxorubicina). Véase Gabizon y col. *J. National Cancer Inst.* 81(19) 1484 (1989).

Las formulaciones terapéuticas de las moléculas de unión al antígeno IL-31 o de antagonistas de la IL-31 humanizados se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen ácido ascórbico y metionina; los conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeni; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween. TM., Pluronic.TM. o polietilenglicol (PEG).

En el presente documento las formulaciones pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afecten de forma adversa al otro. Por ejemplo, adicionalmente podría ser conveniente proporcionar en una formulación anticuerpos que se unan a la IL-31. 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 el fin pretendido.

Los polipéptidos que tienen actividad de unión a la IL-31 se pueden encapsular dentro de liposomas utilizando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31: 1099 (1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", en *Liposome Technology*, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987)). Como se indicó anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una diversidad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993)).

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al anticuerpo, cuyas matrices están en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxiethyl-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como los Lupron Depot.TM. (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros tales como acetato de etilenvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos más corto. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo involucrado se pueden idear estrategias racionales para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S

intermoleculares a través de intercambio tiodisulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices de polímero específicas.

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

10 Como una ilustración, las composiciones farmacéuticas se pueden abastecer como un kit que comprenda un recipiente que comprende una molécula de unión al antígeno IL-31 o antagonista de la IL-31 humanizado (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al polipéptido IL-31). Los polipéptidos terapéuticos se pueden proporcionar en la forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, tal kit puede incluir un dispersador de polvo seco, generador de aerosol líquido o nebulizador, para la administración de un polipéptido terapéutico.

La invención se ilustrará además mediante los siguientes ejemplos.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Determinación de las secuencias de la región variable humanizadas

20 Los anticuerpos monoclonales de ratón anti IL-31 de ser humano se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/430.066, presentada el 8 de mayo de 2006 (Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006-02752960) en trámite junto con la presente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos de ratón anti IL-31 de ser humano descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 11/850.006, presentada el 4 de septiembre de 2008, en trámite junto con la presente, y la solicitud PCT US07/77555, presentada el 4 de septiembre de 2007, del mismo propietario que la presente. Estas secuencias de aminoácidos se utilizaron como material inicial para las secuencias humanizadas descritas en el presente documento. En concreto, la secuencia del anticuerpo de ratón anti IL-31 de ser humano fue a partir de un hibridoma con el número de clon 292.12.3.1.

30 Los nucleótidos que codifican las regiones CDR de los clones 292.12.3.1 se clonaron en un vector de ADNc que codifica la IgG de ser humano de forma tal que los anticuerpos quiméricos se generaron consistiendo en un armazón de IgG de ser humano que alberga las regiones CDR murinas. Se optimizaron los aminoácidos individuales en el anticuerpo quimérico para obtener las características de un anticuerpo monoclonal de alta calidad (afinidad de unión, estabilidad y homogeneidad). Se generaron modelos tridimensionales de cada anticuerpo y se determinaron las regiones variables humanizadas y las regiones CDR humanizadas.

35 Las construcciones que contenían las regiones variables de la cadena pesada y ligera anti IL-31 de ser humano de ratón humanizadas se fusionaron con una región constante de IgG4 de ser humano con una mutación de Ser a Pro en la posición 241 (numeración de Kabat) para inhibir la formación de monómeros de anticuerpos. Las construcciones se expresaron en células HEK2923 y se purificaron en una columna de proteína A seguido del cambio del tampón a PBS. Se midió la afinidad de unión mediante Biacore. La potencia se midió en un ensayo de proliferación BAF y en un ensayo de fosforilación de stat3 en NHK. Se evaluaron las características biofísicas tales como homogeneidad, agregación, y estabilidad del plegamiento.

### 40 Ejemplo 2

#### Expresión de las moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas en células HEK293

45 Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El ADNc del anticuerpo anti IL-31 se compró en Genearth (<http://www.Genearth.com>) y se subclonó en el plásmido de expresión pTT5. La cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) del anticuerpo se mantuvieron en plásmidos independientes. Yves Durocher (Biotechnology Research Institute, National Research Council Canadá) autorizó el pTT5. El plásmido pTT5 se ha caracterizado en las siguientes publicaciones; Durocher y col. NAR 2002; y Pham y col. *Biotechn. Bioeng.* 2003.

50 Para obtener plásmido para la transfección de HEK293-6E, se transformaron de forma química plásmidos que codifican el anticuerpo anti IL-31 en células de *E. coli* TOP10 (n.º de cat. C4040-06, Invitrogen, Taastrup, Dinamarca) y se aislaron a través de columnas de purificación de plásmidos (n.º de cat. 27144, Qiagen, Ballerup, Dinamarca). Se realizó mediante PCR el intercambio de aminoácidos dirigido, con cebadores de DNA technology (<http://www.DNA-technology.dk>), y productos de digestión con Dpn1 (n.º cat. 200518, Clontech a través de Medinova Scientific A/S, Glostrup, Dinamarca). Los plásmidos se secuenciaron en MWG-biotech (<http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.ph>).



Las células HEK293-6E se transfectaron como se describe en el protocolo de 293Fectin (n.º cat. 12347019, Invitrogen, Taastrup, Dinamarca). Brevemente, 15 µg de plásmido LC y 15 µg de plásmido HC se diluyeron en 1 ml de Opti-MEM (n.º cat. 31985-962, Gibco/Invitrogen, Taastrup, Dinamarca) y se mezclaron con 40 µl de 293Fectin diluida en 1 ml de Opti-MEM. Para una transfección convencional se sedimentaron 30 millones de células HEK293-6E y se resuspendieron en 28 ml de medio Freestyle (n.º cat. 12338, Gibco/Invitrogen, Taastrup, Dinamarca) y después se añadió la mezcla de plásmido de 2 ml. En lo sucesivo las células se incubaron durante 6 días a 37 °C, CO2 al 8 %, con agitación (125 rpm), antes de la sedimentación y del muestreo del sobrenadante.

### Ejemplo 3

#### Afinidad de unión de las moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas medida mediante Biacore

##### 10 Introducción

Las interacciones de las proteínas se pueden controlar en tiempo real utilizando análisis de resonancia de plasmón superficial (RPS). En este estudio los inventores realizaron el análisis de RPS en instrumentos Biacore 3000 y Biacore T100, para caracterizar los anticuerpos monoclonales anti IL-31 con respecto a la afinidad contra la IL-31 de ser humano recombinante (IL-31h).

15 Los estudios de afinidad se realizaron utilizando un procedimiento de unión directa, con el anticuerpo monoclonal acoplado covalentemente a la membrana de dextrano carboximetilado (CM5) sobre la superficie del chip sensor a través de grupos amino libres. La IL-31h recombinante se inyectó en diversas concentraciones, seguido de un periodo de disociación con flujo de tampón constante sobre la superficie del chip sensor. Utilizando este diseño experimental, la unión de la IL-31h al anticuerpo monoclonal inmovilizado puede considerarse como una unión 1:1, con una molécula de IL-31h que uniéndose a un sitio de unión de anticuerpo. Los parámetros cinéticos para la interacción se pueden calcular utilizando un modelo de ajuste de langmuir de interacción 1:1.

##### Procedimiento

25 Los anticuerpos monoclonales purificados se inmovilizaron en celdas de flujo individuales sobre un tipo sensor de tipo CM5. Las inmovilizaciones se realizaron utilizando un procedimiento de acoplamiento de amina convencional, con el objetivo de un nivel de inmovilización de 500 Unidades de Resonancia (UR). Los anticuerpos se diluyeron a 1-5 µg/ml en NaAc 10 mM pH 4,5.

30 Como tampón de desarrollo se utilizó HPS-EP pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y Polisorbato P20 al 0,005 %), y como los diluyentes para la IL-31h recombinante (IL-31h, producido en BHK, A1277F, zcytor17lig CEE). La IL-31h se probó en diluciones en serie con factor 3 desde 333,3 nM a 1,4 nM. La asociación (inyección) fue de 4 min, seguida de un periodo de disociación (lavado) de 20 min. El caudal fue de 50 µl/min. Los experimentos se realizaron a 25 °C. La regeneración de la superficie se llevó a cabo mediante la inyección del pulso de 30 s de Glicina-HCL 10 mM pH 1,8 o de ácido fórmico 1 M, a un caudal de 30 µl/min. La detección en todas las celdas de flujo de forma simultánea. La celda de flujo n.º 1 contenía anticuerpo no inmovilizado, y se utilizó para la sustracción del fondo y de los datos sin procesar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

35 El anticuerpo monoclonal murino "parental" se incluyó en todos los experimentos para referencia interna de los parámetros cinéticos obtenidos.

Los parámetros cinéticos se calcularon mediante el ajuste global de los datos utilizando un modelo de unión langmuir 1:1. Se inspeccionaron las limitaciones de transporte de masas de los datos antes del cálculo de los parámetros cinéticos. En algunos experimentos la R<sub>máx</sub> se ajustó de forma local, y la constante RI a 0.

40 Los experimentos se realizaron en instrumentos Biacore 3000 y T100. Los datos se evaluaron utilizando el programa informático de evaluación Biaeval 4.1 y Biacore T100. Los datos se muestran a continuación en la Tabla 2. En este ensayo varios de los clones mostraron afinidad similar a la cepa parental.

Tabla 2:

Número de clon	KD (nM)	kd (1/s)	ka (1/Ms)	Pérdida de potencia relativa (KD)	Pérdida de potencia relativa (kd)
292.12.3.1 (parental)	2,2	6,10E-05	2,80E+04		
7	1,9	5,70E-05	3,30E+04	Similar al parental	Similar al parental
8	1,9	5,40E-05	2,80E+04	Similar al parental	Similar al parental
9	2,1	9,00E-05	4,30E+04	Similar al parental	~1,5x respecto del parental
10	186	1,50E-02	8,80E+05	~85x respecto del parental	~245x respecto del parental

(continuación)

Número de clon	KD (nM)	kd (1/s)	ka (1/Ms)	Pérdida de potencia relativa (KD)	Pérdida de potencia relativa (kd)
11	1,46	7,60E-05	5,20E+04	Similar al parental	Similar al parental
13	24	3,00E-03	1,20E+05	~10x respecto del parental	~50x respecto del parental
14	12,5	7,30E-04	5,90E+04	~5,5x respecto del parental	~12x respecto del parental
16	1,2	7,50E-05	6,10E+04	~0,5x respecto del parental	Similar al parental
17	0,9	6,50E-05	7,00E+04	~0,4x respecto del parental	Similar al parental
18	1,13	6,20E-05	5,50E+04	~0,5x respecto del parental	Similar al parental
21	1,4	9,70E-05	6,90E+04	Similar al parental	Similar al parental
22	1,7	1,10E-04	6,70E+04	Similar al parental	~2x respecto del parental
23	1,4	9,00E-05	6,50E+04	~0,6x respecto del parental	~1,5x respecto del parental
25	0,85	7,20E-05	8,50E+04	~0,5x respecto del parental	Similar al parental
26	0,68	7,00E-05	1,00E+05	~0,4x respecto del parental	Similar al parental
27	0,8	7,90E-05	9,80E+04	~0,5x respecto del parental	~1,3x respecto del parental
28	0,46	5,60E-05	1,20E+05	~0,25x respecto del parental	Similar al parental
29	0,99	8,98E-05	9,00E+04	~0,5x respecto del parental	~1,5x respecto del parental
30	1,1	9,00E-05	7,80E+04	~0,5x respecto del parental	~1,5x respecto del parental
31	0,77	7,00E-05	9,20E+04	~0,4x respecto del parental	Similar al parental
32	0,64	5,90E-05	9,30E+04	~0,3x respecto del parental	Similar al parental
33	1,3	6,80E-05	5,20E+04	~0,6x respecto del parental	Similar al parental
34	1,4	6,90E-05	5,20E+04	~0,6x respecto del parental	Similar al parental
35	1,6	1,00E-04	6,40E+04	~0,7x respecto del parental	~1,5x respecto del parental
36	1,6	1,08E-04	6,80E+04	~0,5x respecto del parental	~1,5x respecto del parental

**Ejemplo 4**

Potencia de las moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas medidas mediante ensayo de proliferación BAF

## 5 A. Medios y tampones

Medio de cultivo: RPMI 1640 con Glutamax (SKN, NN), SFB inactivado por calor al 10 %, P/E al 1 % (BioWhitaker n.º cat. DE17-602E), Geneticina 0,5 mg/ml (GIBCO n.º cat. 10131-019), Zeocina 100 µg/ml (Invitrogen 45-0430), IL3 de ratón 1 ng/ml (TriChem ApS n.º cat. 213-13), Piromicina 2 µg/ml (Sigma-Aldrich P7255).

10 Medio de ensayo: RPMI 1640 con Glutamax (SKN, NN), SFB inactivado por calor al 10 %, P/E al 1 % (BioWhitaker n.º cat. DE17-602E), Geneticina 0,5 mg/ml (GIBCO n.º cat. 10131-019), Zeocina 100 µg/ml (Invitrogen 45-0430), Piromicina 2 µg/ml (Sigma-Aldrich P7255).

Para evaluar la proliferación se utilizó el colorante alamarBlue (BioSource, Dal1100).

B. Anticuerpos, células y citocinas

Los anticuerpos monoclonales anti IL-31 de ser humano se produjeron en Novo Nordisk y se purificaron en Novo Nordisk (Copenhague, Dinamarca). Las células BAF-3(IL-31Rh) se recibieron de ZymoGenetics, Inc. (Seattle, WA) como una línea celular KZS134-BAF3 transfectada con los genes de IL-31R $\alpha$ h y OSMRBh. IL-31 de ser humano recombinante (C108S, descrita en la Patente de Estados Unidos n.º de Publicación 2006-0228329), producida en *E. coli* por ZymoGenetics, Inc.). PM 18 kDa.

C. Ensayo de proliferación

1. Ensayo de estimulación

Las células BAF-3(IL-31Rh) se lavan minuciosamente en medio de Ensayo para eliminar la IL3 residual. Después, las células se siembran en placas de microtitulación de 96 pocillos (placas "view" de fondo plano Packard cat.S00190) a 10<sup>4</sup> células por pocillo. Se añaden a los pocillos diluciones seriadas de IL-31h (10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-15</sup> M) y como control negativo sirven pocillos adicionales con células pero sin IL-31h. Las células se cultivan durante tres días en CO2 al 5 % a 37 °C. Durante las últimas 6 horas de cultivo, se añaden a cada pocillo 10  $\mu$ l de alamarBlue. Se analiza en las células la intensidad de fluorescencia en un espectrofluorómetro (bmg POLARstar+ Galaxy) a una excitación de 555-12 nm y una emisión de 590 nm. Para los análisis de inhibición, se utiliza para estimular a las células una concentración constante de IL-31h. Esta concentración se eligió a base de aproximadamente el 90 % de estimulación máxima en el ensayo de proliferación que en las manos de los inventores significa IL20h 10<sup>-10</sup> M.

2. Ensayo de inhibición.

Se siembran en pocillos de microtitulación 10 x 10<sup>4</sup> células por pocillo de células BAF-3(IL-31Rh) lavadas en medio de ensayo. Se añaden a cada pocillo IL-31h 10<sup>-10</sup> M (concentración final) (excepto algunos pocillos utilizados como control negativo que contienen solamente células. Se añade a los pocillos que ya contenían células y citocinas, diluciones seriadas del anticuerpo (es decir 100  $\mu$ g y con factor 2) (excepto en los pocillos utilizados para los controles positivos que debían contener solamente células + IL-31h). La mezcla de células, citocina y anticuerpo se incuba en 100  $\mu$ l/p durante 72 horas en CO2 al 5 % a 37 °C. Las últimas 6 horas de incubación se incluyen 10  $\mu$ l/p de alamarBlue. Se analiza en las placas la intensidad de fluorescencia en un espectrofluorómetro (bmg POLARstar+ Galaxy) en excitación de 555-12 nm y emisión de 590 nm. Se dibujan las curvas y se calcula la potencia (CI50) utilizando Prism 4(GraphPad PRISM software Inc.). Los datos se muestran a continuación en la Tabla 3. En este ensayo varios de los clones mostraron potencia similar al parental.

Tabla 3: Potencia (nM) de Acm humanizados a IL-31h 1E-10 M

Número de clon	Potencia promedio	Pérdida en veces promedio de la potencia respecto a 292.12.3.1
292.12.3.1 (parental)	1,6	1,0
07	4,5	3,3
08	4,1	2,5
09	28,5	15,1
10	>>	>>
11	22,8	11,6
12	>>	>>
13	109,0	99,1
14	>>	>>
15	10,4	7,7
16	10,6	9,8
17	5,9	5,2
18	8,1	5,9
20	>>	>>
21	4,8	3,5
22	14,0	13,2
23	8,6	7,6

(continuación)

Número de clon	Potencia promedio	Pérdida en veces promedio de la potencia respecto a 292.12.3.1
24	6,0	4,0
25	26,3	16,5
26	9,3	5,8
27	29,1	18,7
28	26,4	17,1
29	12,9	8,3
30	57,8	37,1
31	32,4	25,1
32	18,9	14,7
33	3,1	2,3
35	62,1	75,1
36	14,1	-

**Ejemplo 5**

Potencia de las moléculas de unión al antígeno IL-31 humanizadas medida mediante ensayo de fosforilación de stat3 NHK

5

Cultivo de queratinocitos de ser humano normales y ensayo de fosforilación de STAT3

Los queratinocitos de ser humano normales (NHK) de piel abdominal se obtuvieron de Biopredic Int. (Rennes, Francia) y se cultivaron en Medio Epilife complementado con el kit HKGS de Cascade Biologies (Portland, OR). Para recolectar las células se utilizó un Kit de Desprendimiento que contenía HBSS, tripsina-EDTA y reactivo de neutralización de tripsina que se obtuvo de Promocell (Heidelberg, Alemania). Para medir la fosforilación de STAT3 y determinar la CE50 de la citosina, las NHK se estimularon durante 15 minutos con IL-31 de ser humano recombinante en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los lisados de NHK se probaron en el kit de ELISA tipo “Sándwich” PathScan Phospho-STAT3 de Cell Signaling Technology (Danvers, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se determinó la CI50 de cada anticuerpo neutralizante añadiendo diluciones seriadas de los anticuerpos a las NHK antes de la estimulación durante 15 minutos con una CE80 de IL-31 de ser humano recombinante. Como control isotópico de los anticuerpos se utilizó IgG1 de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) e IgG4 de ser humano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

10

15

Potencias de los anticuerpos dirigidos frente a la IL-31 de ser humano

Los valores de la CI50 (nM) para cada anticuerpo dirigido frente a la IL-31 de ser humano se muestran en la Tabla 4. Para cada experimento, se proporciona un factor Z' según se determina con el programa informático XL Fit. Se muestra el índice de estimulación obtenido con una CE80 de IL-31 de ser humano recombinante. En este ensayo varios de los clones mostraron potencia similar al parental o potencia aceptable.

20

Tabla 4

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
Índice de Estimulación	4,97	4,22	7,61	3,63	6,00	9,05	4,08	6,79	8,70
Factor Z'	0,98	0,98	0,93	0,83	0,91	0,93	0,92	0,95	0,90
Número de Clon									
292.12.3.1 (parental)	0,71	1,90	3,66	8,17	4,48	5,54	5,57	7,06	13,16
7				7,80	3,99	7,74	5,44	7,58	8,82
8				6,74					3,44
9					3,25	7,37	6,59	7,10	
10					68,83	223,87			
13					46,51	210,90			

(continuación)

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
14					71,92	242,30			
16					3,84	6,22			
17					6,65	5,29			
18					2,60	2,68			
25							5,85	7,28	
26							7,84	6,93	
27							3,42	9,59	
28							10,50	5,95	
29							4,49	5,37	
30							14,79	8,71	
31							11,01	7,82	
32							11,53	6,43	
33							4,08	5,68	13,62
34							5,46	8,40	
35									12,04
36									8,95

## CLÁUSULAS

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a IL-31 de ser humano, que comprende:

- 5 a) un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente o que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 y 3, respectivamente; y  
 b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente.

10 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 1, en la que

a) dicho dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 15 i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (FR1), 9 (FR2), 10 (FR3) y 11 (FR4), respectivamente;  
 ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13(FR2), 14 (FR3) y 15 (FR4), respectivamente;  
 iii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13 (FR2), 16 (FR3) y 15 (FR4), respectivamente; y

20 b) dicho dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7, y FR8, que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 19 (FR7) y 20 (FR8), respectivamente; y  
 ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 21 (FR7) y 20 (FR8), respectivamente.

30 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 2, en la que el dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, que consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (FR1), 9 (FR2), 10 (FR3) y 11 (FR4), respectivamente; y en la que el dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7, y FR8, que consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 19 (FR7) y 20 (FR8), respectivamente.

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 2, en la que el dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, que consisten

en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13 (FR2), 14 (FR3) y 15 (FR4), respectivamente; y en la que el dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7, y FR8, que consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 19 (FR7) y 20 (FR8), respectivamente.

5 5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 2, en la que el dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, que consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13 (FR2), 14 (FR3) y 15 (FR4), respectivamente; y en la que el dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7, y FR8, que consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 (FR5), 18 (FR6), 21 (FR7) 10 y 20 (FR8), respectivamente.

6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2-5, en las que el aminoácido en la posición 29 en la FR1 (SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 12) es leucina y el aminoácido en la posición 32 en la FR3 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16) es fenilalanina.

15 7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 6, en la que el aminoácido en la posición 15 en la FR7 (SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21) es tirosina.

8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 7, en la que el aminoácido en la posición 8 en la FR3 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16) es lisina.

9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 6, en la que el aminoácido en la posición 8 en la FR3 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16) es lisina.

20 10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier cláusula anterior, en la que el anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:

- 25 a) un dominio constante de IgG1 de ser humano;  
 b) un dominio constante de IgG2 de ser humano;  
 c) un dominio constante de IgG3 de ser humano;  
 d) un dominio constante de IgG4 de ser humano;  
 e) un dominio constante de IgM de ser humano;  
 f) un dominio constante de IgE de ser humano; y  
 g) un dominio constante de IgA de ser humano.

30 11. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier cláusula anterior, en las que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos F<sub>v</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarios; monocuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

35 12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier cláusula anterior, en las que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende PEG.

13. Una composición farmacéutica que comprende al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier cláusula anterior.

14. Un anticuerpo aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- 40 a) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 47;  
 b) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 48 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 49; y  
 c) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51.

45 15. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano, que comprende:

- 50 a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende una CDR1 y una CDR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y 3 respectivamente y una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de AIYPGDGDTRYXaa1Xaa2FXaa3G (SEQ ID NO: 22), en la que Xaa1 es glutamina o prolina, Xaa2 es serina o lisina y Xaa3 es glutamina o lisina, y en la que dicho dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 1) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (FR1), 9 (FR2), 10 (FR3) y 11 (FR4), respectivamente;

- 2) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13 (FR2), 14 (FR3) y 15 (FR4) respectivamente; y  
 3) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (FR1), 13 (FR2), 16 (FR3) y 15 (FR4) respectivamente;
- 5 y en la que el aminoácido en la posición 29 en la FR1 (SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO: 12) es leucina y el aminoácido en la posición 32 en la FR3 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16) es fenilalanina; y
- b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 (CDR1), 6 (CDR2) y 7 (CDR3), respectivamente, comprendiendo dicho dominio variable de la cadena ligera las regiones marco conservadas FR5, FR6, FR7 y FR8 que tienen una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20, respectivamente, o por lo menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 18, 21 y 20, respectivamente;
- 10 y en el que el aminoácido en la posición 15 en la FR7 (SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21) es tirosina.
16. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 15, en la que Xaa1, Xaa2, y Xaa3 de la SEQ ID NO: 22 se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 a) Xaa1 glutamina, Xaa2 es lisina, y Xaa3 es lisina;  
 b) Xaa1 es prolina, Xaa2 es serina, y Xaa3 es glutamina; y  
 c) Xaa1 es glutamina, Xaa2 es lisina, y Xaa3 es glutamina.
17. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 15, en la que el aminoácido en la posición 8 en la FR3 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16) es leucina.
- 20 18. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15-17, en las que el anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 a) un dominio constante de IgG1 de ser humano;  
 b) un dominio constante de IgG2 de ser humano;  
 c) un dominio constante de IgG3 de ser humano;  
 d) un dominio constante de IgG4 de ser humano;  
 e) un dominio constante de IgM de ser humano;  
 f) un dominio constante de IgE de ser humano; y  
 g) un dominio constante de IgA de ser humano.
- 30 19. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15-18, en las que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; monocuerpos; y anticuerpos multiespecíficos, formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 35 20. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15-19, en las que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende PEG.
21. Una composición farmacéutica que comprende al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las cláusulas 15-20.
- 40 22. Un método de tratamiento de la inflamación en un mamífero, que comprende administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende
- 45 a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente o que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 y 3 respectivamente; y  
 b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7.
23. Un procedimiento de tratamiento del prurito en un mamífero, que comprende administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende
- 50 a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente o que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 y 3 respectivamente; y  
 b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7.





- humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- q) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- 5 r) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- s) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- 10 t) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- 15 u) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- 20 v) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;
- w) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26;
- 25 x) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;
- 30 y) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; y
- 35 z) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.
- 40 25. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 24, en la que le anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
- a) un dominio constante de IgG1 de ser humano;
- b) un dominio constante de IgG2 de ser humano;
- 45 c) un dominio constante de IgG3 de ser humano;
- d) un dominio constante de IgG4 de ser humano;
- e) un dominio constante de IgM de ser humano;
- f) un dominio constante de IgE de ser humano; y
- g) un dominio constante de IgA de ser humano.
26. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 24 o 25, en la que dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; monocuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
27. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 24-26, en las que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende PEG.
- 55 28. Uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación en un mamífero, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende
- a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente o que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 y 3 respectivamente; y
- 60 b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que

## ES 2 570 853 T3

consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7.

29. Uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a la IL-31 de ser humano, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del prurito en un mamífero, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende

- 5 a) un dominio variable de la cadena pesada humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente o que consisten en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4 y 3 respectivamente; y  
 b) un dominio variable de la cadena ligera humanizado que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7.

### 10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc. y Merck Serono S.A.

<120> MOLÉCULAS DE ANTICUERPO HUMANIZADAS ESPECÍFICAS PARA LA IL-31

<130> P33301EP-D1-PCT

<140> 08856113.9

<141> 08-12 2008

<150> 61/012.362

<151> 2007-12-07

<160> 51

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Arg Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 17

ES 2 570 853 T3

<212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 4  
 5  
     Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
       1                  5                  10                  15  
     Gly

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 5  
 10  
                   Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala  
                   1                  5                  10  
 15

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 6  
 20  
                   Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
                   1                  5  
 25

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 7  
 30  
                   Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp Thr  
                   1                  5  
 35

<210> 8  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)...(29)  
 <223> Xaa es Leu o Phe  
 <400> 8  
 40  
                   Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
                   1                  5                  10                  15  
                   Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Xaa Thr  
                           20                  25                  30  
 45

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 50

ES 2 570 853 T3

<400> 9

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

5 <210> 10  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 10

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

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

20 <400> 11

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

25 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)...(29)  
 <223> Xaa es Leu o Phe

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Xaa Thr  
 20 25 30

35 <210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 13

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

45 <210> 14  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 570 853 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)...(8)  
 <223> Xaa es Lys o Thr  
 5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (32)...(32)  
 <223> Xaa es Phe o Arg  
 10

<400> 14  
  
 Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa  
 20 25 30

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20

<400> 15  
  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 25

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)...(8)  
 <223> Xaa es Lys o Thr  
 30

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (32)...(32)  
 <223> Xaa es Phe o Arg  
 35

<400> 16  
  
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa  
 20 25 30

<210> 17  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 45

<400> 17  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 18  
 50

ES 2 570 853 T3

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 19  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)...(15)  
 <223> Xaa es Phe o Tyr

15

<400> 19

20

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Glu Thr Gln Xaa Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 20

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

30

<210> 21  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

35

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)...(15)  
 <223> Xaa es Tyr o Phe

40

<400>21

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

45

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

50

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (13)...(13)  
 <223> Xaa es Gln o Pro

ES 2 570 853 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (14)...(14)  
 <223> Xaa es Ser o Lys  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (16)...(16)  
 <223> Xaa es Gln o Lys  
 10  
 <400> 22  
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Xaa Xaa Phe Xaa  
 1 5 10 15  
 Gly  
 15  
 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20  
 <400> 23  
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 25  
 <210> 24  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <400> 24  
 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 25 30  
 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  
 35  
 <210> 25  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 570 853 T3

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Phe Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

5 <210> 26  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

10 <400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Glu Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

15 <210> 27  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

20 <400> 27



ES 2 570 853 T3

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

5 <210> 28  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 28

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

10 <210> 29  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 29

ES 2 570 853 T3

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

5  
 <210> 30  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 30

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

10  
 15  
 <210> 31  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 31

ES 2 570 853 T3

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

<210> 32  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 32

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

10

<212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 33

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

ES 2 570 853 T3

<210> 34  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 34

```

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

10

<210> 35  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 35

```

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

115

120

20

<210> 36  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 36

ES 2 570 853 T3

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

5 <210> 37  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 37

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

10 <210> 38  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 38

ES 2 570 853 T3

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

<210> 39  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 39

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

10

<210> 40  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 40

ES 2 570 853 T3

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

5 <210> 41  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 41

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

10 <210> 42  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 42

ES 2 570 853 T3

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

<210> 43  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 43

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

10

<210> 44  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 44



ES 2 570 853 T3

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

5  
 <210> 45  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 45

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

10  
 15  
 <210> 46  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 46

ES 2 570 853 T3

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

<210> 47  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 47

ES 2 570 853 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Phe Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
 130 135 140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175  
  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
 195 200 205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
 210 215 220  
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440 445  
 Lys

ES 2 570 853 T3

<210> 48  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 48

```

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

           130           135           140
    Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
    145           150           155           160
    Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
           165           170           175
    Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
           180           185           190
    Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
           195           200           205
    Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
    
```

10 <210> 49  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 49

ES 2 570 853 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr  
20 25 30  
Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Phe Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125  
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140  
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160  
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175  
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190  
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205  
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
210 215 220  
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240  
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255  
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
260 265 270  
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285  
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300  
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320  
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350  
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365  
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380  
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400  
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415  
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430  
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445  
Lys

ES 2 570 853 T3

<210> 50  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 50

```

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

10

<210>51  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

ES 2 570 853 T3

1				5					10				15		
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Arg	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Phe	Pro	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Pro	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115				120						125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			165						170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr
	210					215					220				
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295				300					
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
		355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385					390					395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			405						410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			420					425					430		
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly
		435					440						445		
Lys															

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a la IL-31 de ser humano, que comprende un dominio variable de la cadena pesada humanizado y un dominio variable de la cadena ligera humanizado, en el que el dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende una CDR1, CDR2 and CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y una región marco conservada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 (FR1), SEQ ID NO: 13 (FR2), SEQ ID NO: 14 (FR3) y SEQ ID NO: 15 (FR4), y en el que el dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende una CDR1, CDR2 y CDR3, que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y una región marco conservada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17 (FR5), SEQ ID NO: 18 (FR6), SEQ ID NO: 19 (FR7) y SEQ ID NO: 20 (FR8).
2. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el resto de aminoácido en la posición 29 de la SEQ ID NO: 12 (FR1) es una leucina, y el resto de aminoácido en la posición 32 de la SEQ ID NO: 14 (FR3) es una fenilalanina.
3. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en las que el resto de aminoácido en la posición 8 de la SEQ ID NO: 14 (FR3) es una lisina, y el resto de aminoácido en la posición 15 de la SEQ ID NO: 19 (FR7) es una tirosina.
4. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que el dominio variable de la cadena pesada humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, y el dominio variable de la cadena ligera humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.
5. El fragmento de unión a antígeno monoclonal aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el fragmento de unión a antígeno comprende adicionalmente un dominio F<sub>c</sub>.
6. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende adicionalmente un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en:
  - a) un dominio constante de IgG1 de ser humano;
  - b) un dominio constante de IgG2 de ser humano;
  - c) un dominio constante de IgG3 de ser humano; y
  - d) un dominio constante de IgG4 de ser humano.
7. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina es un dominio constante de IgG4 de ser humano.
8. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el dominio constante de IgG4 de ser humano tiene una mutación de serina a prolina en la posición 241 como se determina por Kabat.
9. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46.
10. Uso del anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dermatitis atópica, dermatitis, prurigo nodular, eccema, prurito, vitíligo, alopecia areata, acné rosácea, acné vulgaris, pénfigo vesicular o dermatitis por contacto.
11. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento de dermatitis atópica, dermatitis, prurigo nodular, eccema, prurito, vitíligo, alopecia areata, acné rosácea, acné vulgaris, pénfigo vesicular o dermatitis por contacto.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, o el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.



Alineamiento de moléculas anti IL-31 humanizadas

**I.N. definiciones y numeración de las CDR de acuerdo con la nomenclatura Kabat/ EU**

HC = cadena pesada; LC = cadena ligera; VD = dominio variable

Injertos de la cadena pesada utilizando como aceptor el gen de la línea germinal VH1-46 de ser humano

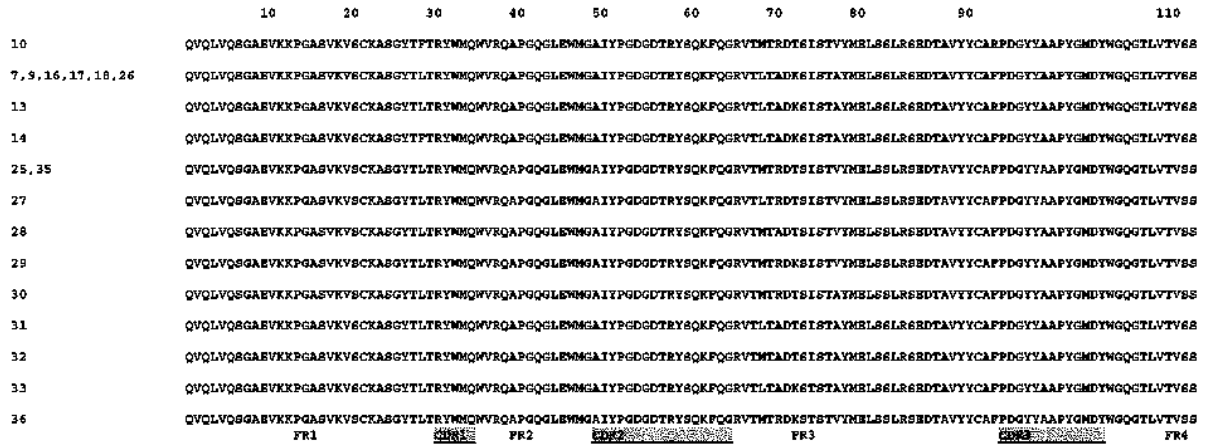


FIGURA 1a

Alineamiento de moléculas anti IL-31 humanizadas

**I.N. definiciones y numeración de las CDR de acuerdo con la nomenclatura Kabat/ EU**

HC = cadena pesada; LC = cadena ligera; VD = dominio variable

Injertos de la cadena pesada utilizando como aceptor el gen de la línea germinal VH5-51 de ser humano

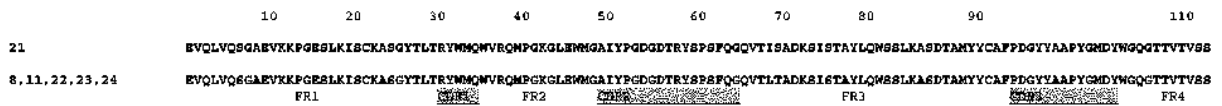


FIGURA 1b

Alineamiento de moléculas anti IL-31 humanizadas

**I.N. definiciones y numeración de las CDR de acuerdo con la nomenclatura Kabat / EU**

HC = cadena pesada; LC = cadena ligera; VD = dominio variable

Injertos de la cadena ligera utilizando como aceptor el gen de la línea germinal VK1-A20 de ser humano

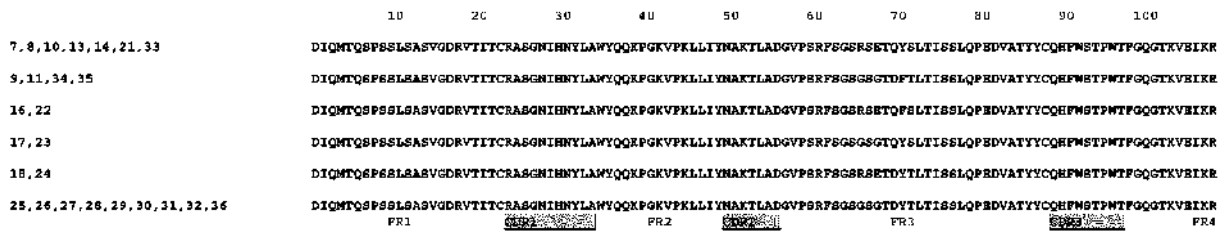


FIGURA 1c