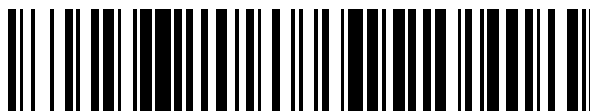


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 340**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2012 PCT/IB2012/053450**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12748547 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2734549**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal contra interleucina-31 de perro**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161510268 P

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

19.10.2017

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**BAMMERT, GARY F. y
DUNHAM, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 638 340 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

Anticuerpo monoclonal contra interleucina-31 de perro

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos monoclonales recombinantes y sus usos en procedimientos clínicos y científicos, que incluyen procedimientos de diagnóstico. La presente invención también proporciona anticuerpos anti IL31 aislados en forma de composiciones veterinarias útiles para el tratamiento de una afección pruriginosa o una afección alérgica en perros.

Antecedentes de la invención

10 El grupo de expertos del American College of Veterinary Dermatology (Colegio Norteamericano de Dermatología Veterinaria) ha definido a la dermatitis atópica como "una enfermedad cutánea alérgica pruriginosa e inflamatoria de predisposición genética, con aspectos clínicos característicos" (Olivry, y col., Veterinary Immunology and Immunopathology 2001; 81:143-146). El grupo de expertos también reconoció que la enfermedad en los caninos se ha asociado con las IgE específicas de alérgeno (Olivry, y col., 2001, citado anteriormente, Marsella & Olivry Clinics in Dermatology 2003; 21:122-133). Los síntomas más destacables y preocupantes para los dueños de mascotas son el prurito grave, junto con alopecia secundaria y el eritema.

15 La prevalencia de la dermatitis atópica no se conoce con precisión debido a los datos epidemiológicos escasos e inconsistentes, pero se estima que es del 10 % de la población total de cánidos (Marsella y Olivry, 2003, citado anteriormente; Scott y col., Canadian Veterinary Journal 2002; 43:601-603, Hillier Veterinary Immunology and Immunopathology 2001; 81:147-151). Están afectados con esta afección crónica y de por vida, aproximadamente 4,5 millones de perros en el mundo. La incidencia parece aumentar. Se han sospechado de una predilección por la raza y el sexo, pero puede variar enormemente dependiendo de la región geográfica (Hillier, 2001, citado anteriormente, Picco, y col., Vet Dermatol; 2008, 19:150-155).

20 Los posibles factores implicados en la dermatitis alérgica son numerosos y están muy poco estudiados. Los componentes del alimento pueden desencadenar la dermatitis atópica (Picco, 2008 citado anteriormente), así como alérgenos ambientales tales como pulgas, ácaros del polvo, la ambrosía, los extractos vegetales, etc. Los factores genéticos también desempeñan un papel importante. Aunque no hay predilección confirmada por una raza, se cree que algún modo de herencia aumenta la predisposición a la dermatitis atópica (Sousa y Marsella Veterinary Immunology and Immunopathology 2001; 81:153-157, Schwartzman y col., Clin. Exp. Immunol. 1971; 9: 549-569).

25 La interleucina-31 (IL-31) es una citocina que se clonó en 2004. La producen principalmente linfocitos T auxiliares (Th)₂ activados (Dillon y col. Nat Immunol 2004; 5:752-60), pero también la producen los mastocitos y los macrófagos. La IL-31 se une a un correceptor que consta del receptor de IL-31 A (RIL-31A) y del receptor de la oncostatina M (ROSM) (Dillon y col. 2004, citado anteriormente y Bilsborough y col. J. Allergy Clin Immunol. 2006 117(2):418-25). La activación del receptor da como resultado la fosforilación de STAT a través del receptor (o receptores) JAK. La expresión del correceptor se ha demostrado en macrófagos, queratinocitos y en los ganglios de la raíz dorsal. Recientemente se ha encontrado que la IL-31 está implicada en la dermatitis, en las lesiones cutáneas pruriginosas, en la alergia y en la hipersensibilidad de las vías respiratorias. Véase la Fig. 1.

30 La estimulación de los linfocitos T con anticuerpos anti CD3 y anti CD28 regula inmediatamente de forma positiva la expresión de ARNm de IL-31 (Dillon y col. 2004, citado anteriormente). El análisis por micromatriz ha demostrado que IL-31 induce determinados genes quimiotácticos, tales como CXCL1, CLL17 (quimiocina regulada por activación y de timo [TARC]), CCL19 (proteína inflamatoria de macrófagos [mezcla] 3β), CCL22 (quimiocina derivada de monocitos [MDC], CCL23 (MIP3) y CCL4 (MIPβ) (Dillon y col. 2004, citado anteriormente).

35 Los ratones transgénicos con expresión aumentada de IL-31 muestran inflamación cutánea, prurito, dermatitis grave y alopecia (Dillon y col. 2004, citado anteriormente). La inyección subcutánea de IL-31 desencadena en ratones la infiltración de células inflamatorias, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos, y da como resultado un engrosamiento epidérmico y acantosis dérmica. En los ratones NC/Nga con dermatitis atópica (DA) debida a causas naturales, IL-31 presenta expresión aumentada en lesiones cutáneas y se correlaciona con prurito (Takaoka y col. Eur J. Pharmacol. 2005; 516, 180-181; Takaoka y col. Exp. Dermatol. 2006; 15, 161-167). Además, en modelos murinos se ha demostrado que la IL-31 induce una rápida aparición de prurito (Raap y col. J. Allergy Clin Immunol. 2008; 122(2):421-3).

40 Estudios adicionales han indicado que la IL-31 está asociada con la inflamación cutánea inducida por dermatitis atópica y el prurito en seres humanos. En pacientes humanos de DA, la expresión de ARNm de IL-31 es considerablemente más alta en lesiones cutáneas que en la piel no lesional, y que la expresión en piel no lesional es mayor que la de la piel normal de pacientes sanos (Sankoly y col. J. Allergy Clin Immunol 2006; 117:411-7). Otro estudio ha informado que los linfocitos T positivos para el antígeno de linfocito cutáneo (CLA) CD45RO⁺ (memoria) en la piel de pacientes de DA, expresan ARNm y proteína IL-31 (Bilsborough y col. 2006, citado anteriormente). También se ha informado de que la expresión aumentada de ARNm de IL-31 en la piel de pacientes o la dermatitis por contacto alérgica se correlaciona con la expresión de ARNm de IL-4 e IL-13, pero no con la expresión de ARNm

de interferón (IFN)- γ (Neis y col. Allergy Clin. Immunol. 2006; 118, 930-937). Además, se ha demostrado que los niveles séricos de IL-31 están elevados en pacientes humanos con urticaria crónica espontánea y aún más en pacientes con DA (Raap y col. Exp Dermatol. 2010; 19(5):464-6). Además, en seres humanos se ha observado una correlación de la gravedad de la DA con los niveles séricos de IL-31 (Rapp y col. 2008, citado anteriormente).
 5 También se ha demostrado que la secreción de IL-31 está potenciada en mastocitos después del entrecruzamiento de IgE y como respuesta al superantígeno estafilocócico en individuos atópicos. Además, se ha demostrado que IL-31 estimula la producción de varios mediadores proinflamatorios, que incluyen IL-6, IL-8, CXCL1, CC17 y múltiples metaloproteinasas en los miofibroblastos colónicos humanos (Yagi, y col. International Journal of Molecular Medicine 2007; 19(6): 941-946).

10 Se considera que la hipersensibilidad de tipo I contra alérgenos ambientales es el principal mecanismo de la DA de cánidos y que los niveles de las citocinas mediadas por Th2, tales como la IL-4, están aumentados en las lesiones cutáneas de perros con DA (Nuttall, y col. Vet. Immunol. Immunopathol. 2002; 87, 379-384). Además, la infiltración de células inflamatorias, linfocitos y neutrófilos, es un mecanismo importante que subyace al empeoramiento de las lesiones cutáneas; la expresión aumentada de los genes quimiotácticos tales como CCL17/TARC, CCR4 y CCL28/
 15 quimiocina epitelial asociada a las mucosas (MEC, del inglés *mucosae-associated epithelial chemokine*) contribuye al empeoramiento de las lesiones cutáneas en los perros con DA (véase, Maeda y col. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005; 103, 83-92; Maeda y col. Vet. Immunol. Immunopathol.2002b; 90, 145-154 y Maeda, y col. J. Vet. Med. Sci. 2008; 70, 51-55).

20 Pruebas recientes han sugerido que la IL-31 podría estar implicada en la estimulación de la inflamación alérgica y en la respuesta epitelial de las vías respiratorias, características del asma alérgico (Chattopadhyay, y col. J Biol Chem 2007; 282:3014-26 y Wai, y col. Immunology, 2007; 122, 532-541). Mizuno y col. (Vet.Imm. 2009, 131 (1-2): 140-143) han clonado la IL-31 canina y han detectado niveles bajos de IL-31 canina en el timo, testículo, bazo y los riñones, pero no en la piel de perros atópicos.

25 Estas observaciones sustentan la hipótesis de que la IL-31 desempeña un papel significativo tanto en las afecciones pruriginosas como en las alérgicas. Sería conveniente proporcionar un anticuerpo terapéutico contra la IL-31 útil para el tratamiento de una afección pruriginosa y/o una afección alérgica en perros y gatos.

Sumario de la invención

La materia objeto de la invención se define a través de las reivindicaciones. La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une de forma específica a la IL-31 de perro. El anticuerpo aislado reduce, inhibe o neutraliza la señalización de pSTAT mediada por IL-31 de perro en un ensayo basado en células. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo monoclonal es quimérico. En otra realización, el anticuerpo está caninizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo reduce, inhibe o neutraliza la actividad de la IL-31 en un perro o gato. En realizaciones preferentes, el anticuerpo reduce, inhibe o neutraliza una afección pruriginosa o una afección alérgica. Las afecciones pruriginosas incluyen, por ejemplo, dermatitis atópica, eccema, psoriasis, esclerodermia y prurito. Las afecciones alérgicas incluyen, por ejemplo, dermatitis alérgica, eccema estival, urticaria, jadeo, enfermedad de las vías respiratorias inflamatoria, obstrucción de las vías respiratorias recurrente, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y procesos inflamatorios que son el resultado de la autoinmunidad, tal como el síndrome del intestino irritable (SII). En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo, que incluye al menos uno de los siguientes:

- una región determinante de complementariedad (CDR)1 de la cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
- una CDR2 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
- una CDR3 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y
- una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo que incluye al menos uno del siguiente grupo:

- una cadena ligera variable (V_L) que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)1 que tiene la secuencia de aminoácidos RASEVDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11E12-VL-CDR1), KSSQSLNNSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);
- una CDR2 de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-

CDR2);

una CDR3 de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

En otras realizaciones adicionales, un anticuerpo que tenga al menos una de las CDR de la cadena ligera variable descrita anteriormente, puede incluir adicionalmente al menos una de las siguientes CDR de la cadena pesada variable:

una región determinante de complementariedad (CDR)1 de la cadena pesada variable que tenga la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);

una CDR2 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYYPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);

una CDR3 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWWGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y

una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede incluir al menos uno de los siguientes:

a) una cadena ligera variable que comprende

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDVNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESIGIPA
 RFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVATYYCQQSNKDPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 19; MU-11 E12-VL),
 DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESDVNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESIGVDP
 RFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 20; CAN-11 E12-VL-cUn-FW2),

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESDVNYGISFMHWFQQKPGQSPQLLIYRASNLESIGVDP
 RFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 21; CAN-11E12-VL-cUn-13),
 DIVMSQSPSSLVSAGDKVTITCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQKPGQPPKLLIYGASTRES
 GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 22; MU-19D07-VL),
 EIVMTQSPASLSLQEEKVTITCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQKPGQAPKLLIYGASTRESGV
 PSRFSGSGSGTDFSTISSLEPEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 23;

CAN-19D07-VL-998-1),
 DILLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDVNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLEAGVPT
 RFSGSGSRTDFTLTNIHPVEEEDAATYFCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 24; MU-34D03-VL) o
 EIVMTQSPASLSLQEEKVTITCKSSQSFAGTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLEAGVPS
 RFSGSGSGTDFSTISSLEPEDVAVYYCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 25; CAN-34D03-VL-998-1);

b) una cadena pesada variable que comprende

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFKYYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGGTKYNE
 TFKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARGGTSVIRDAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 26; MU-11 E12-VH),

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYTFKYYDINWVRQAPGAGLDWMGWIFPGDGGTKYN
 ETFKGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCARGGTSVIRDAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 27; CAN-11E12-VH-415-1),

EVKLVESSGGDLVKGSSLRSLSCAASGFASFSSYDMSWVRQIPEKRLEWVATITSGGGYTYSADS
 VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTAVYYCARQNWVGLAYWGQGTSTVTVSA (SEQ ID NO: 28; MU-19D07-VH),

EVQLVESSGGDLVKGSSLRSLSCVASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLQWVATITSGGGYTYS
 DSVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARQNWVGLAYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 29; CAN-19D07-VH-400-1),

EVQLVESSGGDLVKGSSLRSLSCAASGFSSNYGMSWVRQTPDKRLEWVATISYGGSYTYYPD
 NIKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 30; MU-34D03-VH) o

EVQLVESSGGDLVKGSSLRSLSCVASGFTFSSNYGMSWVRQAPGKGLQWVATISYGGSYTYYP
 DNIKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 31; CAN-34D03-VH-568-1); y

c) variantes de las mismas que tengan una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une de forma específica a una región entre los restos de aminoácidos aproximadamente 95 y 125 de la secuencia de aminoácidos de la IL-31 canina de SEQ ID NO: 32. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une de forma específica a una región entre los restos de aminoácidos aproximadamente 102 y 122 de la secuencia de aminoácidos de la IL-31 canina de SEQ ID

NO: 32.

La presente invención también proporciona una composición veterinaria que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo descrito anteriormente.

5 En otras realizaciones, la invención proporciona una célula hospedadora que produce un anticuerpo descrito anteriormente.

En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de los siguientes:

10 una región determinante de complementariedad (CDR)₁ de la cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11 E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
 una CDR2 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
 15 una CDR3 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWVVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y
 una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

20 En realizaciones adicionales, el ácido nucleico aislado descrito anteriormente puede incluir adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de los siguientes:

25 una cadena ligera variable (V_L) que comprende una determinante de complementariedad (CDR)₁ que tiene la secuencia de aminoácidos RASEVDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11E12-VL-CDR1), KSSQSLNLSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);
 una CDR2 de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-CDR2);
 30 una CDR3 de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y
 una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 or CDR3.

35 La presente invención proporciona adicionalmente un vector que incluye al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

40 En otras realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedadora descrita anteriormente, en condiciones que dan como resultado la producción del anticuerpo, y aislar el anticuerpo de la célula hospedadora o del medio de cultivo de la célula hospedadora. También se proporciona un anticuerpo para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno seleccionado de una afección pruriginosa o una afección alérgica, que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la afección pruriginosa se selecciona de dermatitis atópica, eccema, psoriasis, esclerodermia y prurito. En otras realizaciones, la afección alérgica a tratar se selecciona de dermatitis alérgica, eccema estival, urticaria, jadeo, enfermedad de las vías respiratorias inflamatoria, obstrucción de las vías respiratorias recurrente, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y procesos inflamatorios que son el resultado de la autoinmunidad, tal como el síndrome del intestino irritable (SII).

Además se proporciona un anticuerpo para su uso en el tratamiento de un perro que lo necesite, inhibiendo la actividad de la IL-31 en un perro, administrando un anticuerpo descrito anteriormente.

50 También se proporciona un procedimiento de detección o cuantificación de IL-31 a una muestra, incluyendo el procedimiento incubar una muestra clínica o biológica que contiene IL-31 en presencia de un anticuerpo descrito anteriormente y detectar el anticuerpo que está unido a la IL-31 en la muestra. En una realización, el anticuerpo está marcado de forma detectable. En otra realización, el anticuerpo no está marcado y se utiliza en combinación con un segundo anticuerpo que está marcado.

55 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una representación esquemática de la ruta de IL-31.

La Figura 2 es una representación esquemática de la estructura general de una molécula de inmunoglobulina G

(IgG) de ratón que destaca el sitio de unión a antígeno.

La Figura 3 es una representación esquemática de la estructura general de una IgG quimérica de ratón:canina.

La Figura 4 es una ilustración que muestra la especiación o "caninización" de una IgG de ratón, las CDR de ratón están injertadas en las regiones marco conservadas de cánido identificadas a partir de las bases de datos de secuencias.

La Figura 5 es una ilustración de un anticuerpo monoclonal "heteroquimérico" que empareja la cadena ligera quimérica con una cadena pesada completamente caninizada.

Figura 6 Títulos de ELISA de ratones inmunizados con IL-31 (CF-1 MU#1 - 4) con respecto a los ratones de control positivos y de antes de la extracción de sangre.

La Figura 7 es una ilustración de las cadenas variables de anticuerpo que muestran los cebadores para las regiones constantes y cebadores degenerados dirigidos a las regiones variables de ratón.

La Figura 8 es un gráfico de la eficacia piloto de 11 E12 quimérico en un estudio SC, de dosis única, controlado por placebo (76A60).

La Figura 9 es una tabla que muestra las puntuaciones de prurito individuales de los perros incluidos en el estudio 76A60.

La Figura 10 es de transferencias de Western que muestran la unión de las versiones quimérica (transferencia n.º 1), caninizada (transferencia n.º 2) y heteroquimérica (transferencias n.º 3 y 4) de 11 E12 a la IL-31 canina. La heteroquimera en la transferencia n.º 3 tiene una cadena ligera caninizada emparejada con una cadena pesada quimérica. La heteroquimera en la transferencia n.º 4 tiene la cadena ligera quimérica emparejada con la cadena pesada caninizada. Cada transferencia a nitrocelulosa contiene carril izquierdo, patrones de proteína preteñidos (Seebblue plus 2, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y carril derecho, 800 ng de IL-31 canina.

La Figura 11 es un visión de conjunto esquemática del trabajo de sustitución de la región marco conservada de la cadena ligera de 11 E12 caninizada.

La Figura 12 es de transferencias de Western que muestran la unión de las versiones caninizadas de 11 E12 con retromutaciones individuales a restos de la cadena ligera de la región marco conservada 2 de ratón. Cada transferencia a nitrocelulosa contiene carril izquierdo, patrones de proteína preteñidos (Seebblue plus 2, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y carril derecho, 800 ng de IL-31 canina.

La Figura 13 es de transferencias de Western con las proteínas IL-31 canina de longitud completa y trunca. Las transferencias a nitrocelulosa individuales se sondaron con los anticuerpos A) anti His B) 34D03 y C) 11E12. Los carriles 1-9 de las transferencias corresponden a lo siguiente: Carril 1 - patrones de proteína preteñidos (Seebblue plus 2, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); Carril 2 - IL-31 canina de longitud completa; Carril 3 - truncamiento N-terminal -20N; Carril 4 - truncamiento N-terminal -40N; Carril 5 - truncamiento N-terminal -60N; Carril 6 - truncamiento C-terminal -20C; Carril 7 - truncamiento C-terminal -40C; Carril 8 - truncamiento C-terminal -60C y Carril 9 - betagalactosidasa (lacZ). Nota: la IL-31 de longitud completa y las proteínas con truncamientos C-terminales (-20, -40C y -60C) no mostraron expresión detectable en estas condiciones.

La Figura 14 es de transferencias de Western con las proteínas IL-31 caninas truncadas. Las transferencias a nitrocelulosa individuales se sondaron con los anticuerpos A) anti His B) 11 E12 y C) 34D03. Los carriles 1-5 de las transferencias corresponden a lo siguiente: Carril 1 - patrones de proteína preteñidos (Seebblue plus 2, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); Carril 2 - truncamientos C-terminales en las posiciones 20-122; Carril 3 - truncamientos C-terminales en las posiciones 20-100; Carril 4 - truncamientos C-terminales en las posiciones 20-80 y Carril 5 - beta-galactosidasa (lacZ).

La Figura 15 es un corte de las transferencias de Western con lisados de cepas de *E. coli* que expresan la IL-31 canina con alaninas que sustituyen cada posición de aminoácido (76-122). Las transferencias a nitrocelulosa individuales se sondaron con los anticuerpos anti His, 11 E12 y 34D03, como se muestra en la Figura.

La Figura 16 es un corte de transferencias de Western con dobles y triples mutaciones en la IL-31 canina. El lisado de proteína -20N se corrió como un control positivo.

La Figura 17 es un gráfico que muestra las puntuaciones de prurito para perros a los que se inyectó anticuerpo 34D03 caninizado (1,0 mg/kg) por vía subcutánea. Las puntuaciones de prurito se midieron en cada día del estudio antes (respuesta de medida inicial) y después (respuesta de 2 horas) de la exposición a IL-31 canina 1,5 µg/kg.

La Figura 18 es un SDS PAGE Bis Tris al 4-12 % con las proteínas IL-31 canina y felina purificadas. El panel A muestra la tinción por coomassie de las proteínas procesadas en condiciones reductoras. El panel B muestra la tinción por coomassie de las proteínas procesadas en condiciones no reductoras. Los paneles C y D son

transferencias de Western de geles idénticos a A y B, respectivamente, sondadas con un anticuerpo anti His. Carril 1 - IL-31 canina; Carril 2 - IL-31 felina; Carril 3 - patrones de proteína preteñidos (Seebblue plus 2, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); Carril 4 - IL-31 canina y Carril 5 - IL-31 felina.

5 La Figura 19 es un gráfico de la señalización de pSTAT en monocitos DH-82 caninos, inducida por las IL-31 canina y felina producidas en *E. coli*. IL-31 canina (CHO) es la proteína de referencia utilizada para todos los ensayos basados en células anteriores, el modelo de prurito de perro y como el inmunógeno para la identificación inicial de anticuerpos.

La Figura 20 es un alineamiento que muestra la conservación de secuencia entre las IL-31 felina y canina en la región de la proteína implicada en la unión de los anticuerpos 11E12 y 34D03 (anotado con un signo más (+)).

10 La Figura 21 es de transferencias de Western con las proteínas IL-31. Las transferencias a nitrocelulosa individuales se sondaron con anticuerpos A) anti His B) 11E12 y C) 34D03. Nota - IL-31 canina (CHO) no contiene una etiqueta de 6-His.

La Figura 22 es un gráfico que muestra la inhibición de la señalización de pSTAT inducida por la IL-31 canina en monocitos DH82 caninos, que compara el anticuerpo 34D03 felinizado y caninizado.

15 La Figura 23 es una transferencia de Western de las IL-31 canina y felina en condiciones reductoras, sondada con el anticuerpo 34D03 felinizado.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es una CDR1 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 11 E12-VH-CDR1;
 20 SEQ ID NO: 2 es una CDR1 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 19D07-VH-CDR1;
 SEQ ID NO: 3 es una CDR1 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 34D03-VH-CDR1;
 25 SEQ ID NO: 4 es una CDR2 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 11 E12-VH-CDR2;
 SEQ ID NO: 5 es una CDR2 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 19D07-VH-CDR2;
 SEQ ID NO: 6 es una CDR2 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 34D03-VH-CDR2;
 30 SEQ ID NO: 7 es una CDR3 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 11 E12-VH-CDR3;
 SEQ ID NO: 8 es una CDR3 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 19D07-VH-CDR3;
 SEQ ID NO: 9 es una CDR3 de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como 34D03-VH-CDR3;
 35 SEQ ID NO: 10 es una CDR1 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 11E12-VL-CDR1;
 SEQ ID NO: 11 es una CDR1 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 19D07-VL-CDR1;
 40 SEQ ID NO: 12 es una CDR1 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 34D03-VL-CDR1;
 SEQ ID NO: 13 es una CDR2 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 11E12-VL-CDR2;
 SEQ ID NO: 14 es una CDR2 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 19D07-VL-CDR2;
 45 SEQ ID NO: 15 es una CDR2 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 34D03-VL-CDR2;
 SEQ ID NO: 16 es una CDR3 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 11E12-VL-CDR3;
 50 SEQ ID NO: 17 es una CDR3 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 19D07-VL-CDR3;
 SEQ ID NO: 18 es una CDR3 de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como 34D03-VL-CDR3;
 SEQ ID NO: 19 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-11 E12-VL;
 55 SEQ ID NO: 20 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11E12-VL-cUn-FW2
 SEQ ID NO: 21 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11 E12-VL-cUn-13;
 60 SEQ ID NO: 22 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-

19D07-VL;
 SEQ ID NO: 23 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-19D07-VL-998-1;
 SEQ ID NO: 24 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-34D03-VL;
 SEQ ID NO: 25 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-34D03-VL-998-1;
 SEQ ID NO: 26 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-11E12-VH;
 SEQ ID NO: 27 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-11E12-VH-415-1;
 SEQ ID NO: 28 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-19D07-VH;
 SEQ ID NO: 29 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-19D07-VH-400-1;
 SEQ ID NO: 30 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-34D03-VH;
 SEQ ID NO: 31 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-34D03-VH-568-1;
 SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos que corresponde al N.º de Referencia de GenBank C7G0W1 y corresponde a la proteína IL-31 Canina de longitud completa;
 SEQ ID NO: 33 es la secuencia de nucleótidos que corresponde al N.º de Referencia de GenBank C7G0W1 y corresponde a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 Canina de longitud completa;
 SEQ ID NO: 34 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-11 E12-VL;
 SEQ ID NO: 35 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-11 E12-VH;
 SEQ ID NO: 36 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-19D07-VL;
 SEQ ID NO: 37 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-19D07-VH;
 SEQ ID NO: 38 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como MU-34D03-VL;
 SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como MU-34D03-VH;
 SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada canina denominada en el presente documento como HC-64 (N.º de Referencia de GenBank AF354264);
 SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena pesada canina denominada en el presente documento como HC-64 (N.º de Referencia de GenBank AF354264);
 SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada canina denominada en el presente documento como HC-65 (N.º de Referencia de GenBank AF354265);
 SEQ ID NO: 43 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena pesada canina denominada en el presente documento como HC-65 (N.º de Referencia de GenBank AF354265);
 SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena ligera canina denominada en el presente documento como kappa (N.º de Referencia de GenBank XP_532962);
 SEQ ID NO: 45 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena ligera canina denominada como kappa (N.º de Referencia de GenBank XP_532962);
 SEQ ID NO: 46 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-19D07-VL-998-1;
 SEQ ID NO: 47 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-19D07-VH-998-1;
 SEQ ID NO: 48 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-34D03-VL-998-1;
 SEQ ID NO: 49 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-34D03-VH-568-1;
 SEQ ID NO: 50 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11E12-VL-cUn-FW2;
 SEQ ID NO: 51 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como CAN-11E12-VH-415-1;
 SEQ ID NO: 52 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11 E12-VL-cUn-13;
 SEQ ID NO: 53 es la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11E12_VL_cUn_1;
 SEQ ID NO 54 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como CAN-11E12-VL-cUn-1;
 SEQ ID NO: 55 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la construcción de longitud completa de IL-31

canina utilizada en el presente documento para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 56 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de longitud completa de IL-31 canina utilizada en el presente documento para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina -20N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 58 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina -20N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 59 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina -40N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 60 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina -40N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 61 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina -60N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 62 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina -60N para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 63 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina 20-122 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 64 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina 20-122 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 65 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina 20-100 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 66 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina 20-100 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 67 es la secuencia de aminoácidos de la construcción de IL-31 canina 20-80 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 68 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 canina 20-80 para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 69 es la secuencia de nucleótidos que corresponde a la construcción de IL-31 felina de longitud completa para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 70 es la secuencia de aminoácidos que corresponde a la construcción de IL-31 felina de longitud completa para la expresión en *E. coli*;
 SEQ ID NO: 71 es una secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como FEL-34D03-VL-021-1;
 SEQ ID NO: 72 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena ligera variable denominada en el presente documento como FEL-34D03-VL-021-1;
 SEQ ID NO: 73 es una secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como FEL-34D03-VH-035-1;
 SEQ ID NO: 74 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la cadena pesada variable denominada en el presente documento como FEL-34D03-VH-035-1;
 SEQ ID NO: 75 es la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena pesada felina denominada en el presente documento como HC-A Felina (N.º de referencia de GenBank AB016710.1);
 SEQ ID NO: 76 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena pesada felina denominada en el presente documento como HC-A Felina (N.º de referencia de GenBank AB016710.1);
 SEQ ID NO: 77 es la secuencia de aminoácidos para la región constante de la cadena ligera felina denominada en el presente documento como LC-Kappa Felina (N.º de Referencia de GenBank AF198257.1);
 SEQ ID NO: 78 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena ligera felina denominada en el presente documento como LC-Kappa Felina (N.º de referencia de GenBank AF198257.1);

Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, se definirán varios términos utilizados en el contexto de la presente invención. Además de estos términos, se definen otros en otras partes de la memoria descriptiva, según sea necesario. A menos que en el presente documento se defina otra cosa de forma expresa, los términos de la técnica utilizados en la presente memoria descriptiva tendrán los significados reconocidos en la técnica.

Como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto estipule claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye una pluralidad de tales anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “que comprende” está destinado a significar que las composiciones y los procedimientos incluyen los elementos señalados, pero sin excluir otros.

Epítipo, como se usa en el presente documento, se refiere al determinante antigénico que reconocen las CDR del anticuerpo. En otras palabras, epítipo se refiere a la porción de cualquier molécula que tenga la capacidad de reconocer, o de unirse a, un anticuerpo. A menos que se indique otra cosa, el término “epítipo” como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región de la IL-31 con la que es reactivo un agente anti IL-31.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula a la que tiene capacidad de unirse un anticuerpo que, de forma adicional, tiene la capacidad de ser reconocido por, y unirse a, un anticuerpo (la correspondiente región de unión a anticuerpo puede denominarse como un paratopo). En general, los epítomos consisten en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activas, por ejemplo, cadenas laterales de aminoácidos o azúcares, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

La expresión "de forma específica", en el contexto de la unión de anticuerpos, se refiere a la alta avidéz y/o alta afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno específico, es decir, un polipéptido o epítomo. En muchas realizaciones, el antígeno específico es un antígeno (o un fragmento o subfracción de un antígeno) utilizado para inmunizar al hospedador animal del que se han aislado células productoras de anticuerpos. La unión de forma específica de un anticuerpo a un antígeno es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a otros antígenos. Los anticuerpos que se unen de forma específica a un polipéptido pueden tener la capacidad de unirse a otros polipéptidos a un nivel débil pero detectable (por ejemplo, el 10 % o menos de la unión mostrada con el polipéptido de interés). Tal unión débil, o unión de fondo, es fácilmente discernible de la unión específica de un anticuerpo a un polipéptido objeto, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados. En general, los anticuerpos específicos se unen a un antígeno con una afinidad de unión con una K_D de 10^{-7} M o menos, por ejemplo, 10^{-8} M o menos (por ejemplo, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} o menos, 10^{-11} o menos, 10^{-12} o menos o 10^{-13} o menos, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta que tiene dos cadenas ligeras y dos pesadas. Por lo tanto, un anticuerpo aislado individual, o un fragmento, puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo heteroquimérico o un anticuerpo caninizado. El término "anticuerpo" se refiere preferentemente a anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, y a equivalentes de unión inmunológicos de los mismos que pueden unirse a la proteína IL-31 o fragmentos de la misma. El término anticuerpo se utiliza para referirse a una molécula homogénea o a una mezcla tal como un producto sérico compuesto de una pluralidad de distintas entidades moleculares.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que la cantidad de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los distintos isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracadena espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. La FIG. 2 es un ejemplo de la estructura general de una inmunoglobulina G (IgG) de ratón nativa, que destaca el sitio de unión a antígeno.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a menos que una estructura de anticuerpo intacta, que incluye, pero sin limitación, una cadena de anticuerpo individual aislada, una construcción Fv, una construcción Fab, una construcción Fc, una secuencia de la región variable de la cadena ligera o determinante de complementariedad (CDR), etc.

La expresión región "variable" comprende la región marco conservada y las CDR (conocidas de otra forma como hipervariables) y se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren en secuencia de forma extensa entre anticuerpos, y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno múltiples FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles de conexión y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina α . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat, y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), páginas 647-669). Los dominios constantes no están implicados de forma directa en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La expresión "región hipervariable", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (Kabat, y col. (1991), citado anteriormente) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Los restos de la "región marco conservada" o "FR" son los restos del dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y aún tiene la capacidad de entrecruzar antígeno.

5 "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . De forma colectiva, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un
10 único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos al extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab', en que el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros
15 acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

20 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), a base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a distintas clases. Actualmente existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2 (según se define por la designación en ratón y ser humano). Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se llaman *alfa*, *delta*, *epsilon*, *gamma* y *mu*, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulina son bien conocidas en múltiples especies. La prevalencia de los isotipos individuales y las actividades funcionales asociadas con estos dominios constantes son específicos de especie y deben definirse de forma experimental.
25
30

"Anticuerpo monoclonal", como se define en el presente documento, es un anticuerpo producido por un único clon de células (en concreto, un único clon de células de hibridoma) y, por lo tanto, es un único tipo homogéneo puro de anticuerpo. Todos los anticuerpos monoclonales producidos a partir del mismo clon son idénticos y tienen la misma especificidad antigénica. El término "monoclonal" concierne a un único clon de células, a una única célula y a la progenie de esa célula.
35

En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen, de forma específica, anticuerpos (inmunoglobulina) "quiméricos", en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos obtenidos de una especie particular, mientras que la cadena (o cadenas) restante es idéntica u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Normalmente, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de las cadenas ligera y pesada se han construido, normalmente, mediante ingeniería genética, a partir de los genes de la región variable y constante de anticuerpos que pertenecen a distintas especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a los segmentos constantes de cánido. La FIG. 3 es una representación esquemática de la estructura general de una realización de una IgG de ratón: cánido. En esta realización, el sitio de unión a antígeno se obtiene de ratón mientras que la porción F_c es de cánido.
40
45

Las formas "caninizadas" de anticuerpos no caninos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos modificados por ingeniería genética que contienen una secuencia mínima obtenida de una inmunoglobulina que no es canina. Los anticuerpos caninizados son secuencias de inmunoglobulinas caninas (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de la región hipervariable del receptor se reemplazan con restos de la región hipervariable de una especie que no es canina (anticuerpo donante), tal como de ratón, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de las secuencias de inmunoglobulina canina se reemplazan con los correspondientes restos no caninos. Adicionalmente, los anticuerpos caninizados pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar aún más el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo caninizado incluirá de forma sustancial todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden con las de una secuencia de inmunoglobulina que no es canina y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina canina. El anticuerpo caninizado, de forma opcional, comprenderá una región constante (F_c) de inmunoglobulina completa, o al menos
50
55
60

una porción, normalmente la de una secuencia de inmunoglobulina canina. La FIG. 4 es una ilustración de una realización que muestra la especificación o caninización de una IgG de ratón. En esta realización, las CDR de ratón se injertan en regiones marco conservadas caninas.

5 Las formas "felinizadas" de anticuerpos no felinos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos modificados por ingeniería genética que contienen mínimas secuencias obtenidas de una inmunoglobulina no felina. Los anticuerpos felinizados son secuencias de inmunoglobulina felina (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de la región hipervariable del receptor se reemplazan con restos de la región hipervariable de una especie no felina (anticuerpo donante), tal como de ratón, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de las secuencias de inmunoglobulina felina se reemplazan con los correspondientes restos que no son de felino. Adicionalmente, los anticuerpos felinizados pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para perfeccionar aún más el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo felinizado incluirá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una secuencia de inmunoglobulina no felina y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina felina. De forma opcional, el anticuerpo felinizado también comprende una región constante (Fc) de inmunoglobulina completa, o al menos una porción, normalmente la de una secuencia de inmunoglobulina felina.

20 El término "heteroquímico", como se define en el presente documento, se refiere a un anticuerpo en el cual una de las cadenas de anticuerpo (pesada o ligera) está caninizada mientras que la otra es quimérica. La FIG. 5 representa una realización de una molécula heteroquímica. En esta realización, una cadena pesada variable caninizada (en donde todas las CDR son de ratón y todas las FR son de cánido) está emparejada con una cadena ligera variable quimérica (en donde todas las CDR son de ratón y todas las FR son de ratón). En esta realización, tanto las cadenas pesada variable como ligera variable están fusionadas con una región constante canina. Un anticuerpo anti IL-31 "variante", se refiere en el presente documento a una molécula que difiere de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti IL-31 "parental" en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o más restos de aminoácido en la secuencia del anticuerpo parental, y conserva al menos una actividad deseada del anticuerpo anti IL-31 parental. Las actividades deseadas pueden incluir la capacidad de unirse al antígeno de forma específica, la capacidad de reducir, inhibir o neutralizar la actividad de la IL-31 en un animal, y la capacidad de inhibir la señalización de pSTAT mediada por IL-31 en un ensayo basado en células. En una realización, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables y/o marco conservadas del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco sustituciones en una o más regiones marco conservadas y/o hipervariables del anticuerpo parental. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias del dominio variable de las cadenas pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y muy preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencia. Identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del anticuerpo parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr la máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas, en la secuencia del anticuerpo, se considerará que afecten a la identidad de secuencia u homología. La variante conserva la capacidad de unirse a la IL-31 y, preferentemente, tiene actividades deseadas que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, capacidad potenciada para reducir, inhibir o neutralizar la actividad de la IL-31 en un animal, y/o la capacidad potenciada de inhibir la señalización de pSTAT mediada por la IL-31 en un ensayo basado en células.

50 Un ácido nucleico "variante", se refiere en el presente documento a una molécula que difiere en secuencia de un ácido nucleico "parental". La divergencia en la secuencia de polinucleótidos puede ser el resultado de cambios mutacionales tales como delecciones, sustituciones o adiciones de uno o más nucleótidos. Cada uno de estos cambios puede producirse solo o en combinación, una o más veces en una secuencia dada.

55 El anticuerpo "parental", en el presente documento, es uno que está codificado en una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo parental tiene una región marco conservada canina y, si está presente, tiene la región (o regiones) constante del anticuerpo canino. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo caninizado o canino. Como otro ejemplo, el anticuerpo parental es un anticuerpo monoclonal murino.

60 El término "aislado" significa que el material (por ejemplo, anticuerpo o ácido nucleico) se separa y/o se recupera de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del material, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Con respecto al ácido nucleico, un ácido nucleico aislado puede incluir uno que se separa de las secuencias 5' a 3' con las que está normalmente asociado en el cromosoma. En realizaciones preferentes, el material se purificará hasta más del 95 % en peso del material, y muy preferentemente más del 99 % en peso. El material aislado incluye el material *in situ* dentro de las células recombinantes, dado que al menos un

componente del entorno natural del material no estará presente. Normalmente, sin embargo, el material aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

5 La palabra "marcador", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado de forma directa o indirecta al anticuerpo o ácido nucleico. El propio marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto sustrato o composición que sea detectable.

10 Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido", "molécula de ácido nucleico" y similares, pueden utilizarse indistintamente en el presente documento y se refieren a una serie de bases nucleotídicas (también llamadas "nucleótidos") en el ADN y ARN. El ácido nucleico puede contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. La expresión "ácido nucleico" incluye, por ejemplo, moléculas monocatenarias y bicatenarias. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un gen o fragmento de gen, exones, intrones, una molécula de ADN (por ejemplo, ADNc), una molécula de ARN (por ejemplo, ARNm), ácidos nucleicos recombinantes, plásmidos y otros vectores, cebadores y sondas. Están incluidos polinucleótidos tanto 5' a 3' (sentido) como 3' a 5' (antisentido).

15 Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un perro que necesita tratamiento, que puede ser afectado por moléculas de la invención.

20 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad eficaz") se refiere a una cantidad de un principio activo, por ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados cuando se administra a un sujeto o paciente. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención. En el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una que produce un cambio medido de forma objetiva en uno o más parámetros asociados con el tratamiento de una afección pruriginosa o una afección alérgica, incluyendo la mejora clínica de los síntomas. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto particular y de la afección tratada, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular elegido, la pauta posológica a seguir, la temporización de la administración, el compuesto particular elegido, la pauta posológica a seguir, la temporización de la administración, la manera de administración y similares, todos los cuales puede determinar fácilmente un experto en la materia.

30 Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" abarca el espectro completo de tratamientos para una enfermedad o trastorno. Un agente "terapéutico" de la invención puede actuar de una manera que es profiláctica o preventiva, incluyendo las que incorporan procedimientos diseñados para dirigirlos a animales que pueden identificarse como estando en riesgo (farmacogenética), o de una manera que es mejoradora o de naturaleza curativa, o puede actuar para frenar la velocidad o alcance de la progresión de al menos uno de los síntomas de una enfermedad o trastorno a tratar.

35 "Tratamiento", "que trata", y similares, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas y preventivas. Los animales que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como en los que debe prevenirse el trastorno. El término "tratamiento" de, o "que trata", una enfermedad o trastorno, incluye prevenir o proteger frente a la enfermedad o trastorno (es decir, provocar que los síntomas clínicos no se desarrollen); inhibir la enfermedad o trastorno (es decir, detener o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos) y/o aliviar la enfermedad o trastorno (es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos). Como se apreciará, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" una enfermedad o trastorno, dado que el acontecimiento o acontecimientos inductivos definitivos pueden ser desconocidos o estar latentes. Por consiguiente, el término "profilaxis" se entenderá que constituye un tipo de "tratamiento" que abarca tanto "prevenir" como "suprimir". Por lo tanto, el término "tratamiento" incluye "profilaxis".

45 La expresión "afección alérgica" se define en el presente documento como un trastorno o enfermedad provocado por una interacción entre el sistema inmunitario y una sustancia extraña para el cuerpo. Esta sustancia extraña se denomina "un alérgeno". Los alérgenos comunes incluyen aeroalérgenos, tales como pólenes, polvo, mohos, proteínas de ácaros del polvo, saliva inyectada de mordeduras de insectos, etc. Los ejemplos de afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, los siguientes: dermatitis alérgica, eccema estival, urticaria, jadeo, enfermedad de las vías respiratorias inflamatoria, obstrucción de las vías respiratorias recurrente, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y procesos inflamatorios que son el resultado de la autoinmunidad, tal como el síndrome del intestino irritable (SII).

55 La expresión "afección pruriginosa", como se define en el presente documento, es una enfermedad o trastorno caracterizado por una sensación de picor intensa, que produce la necesidad imperiosa de rascarse o frotarse la piel para obtener alivio. Los ejemplos de afecciones pruriginosas incluyen, pero sin limitación, las siguientes: dermatitis atópica, eccema, psoriasis, esclerodermia y prurito.

Como se usa en el presente documento, los términos o expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular", pueden utilizarse indistintamente. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es cualquiera y todas las

generaciones posteriores. Se comprende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" se refiere a una célula procariota o eucariota (por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células de mamífero y células de insecto), ya sea se emplacen *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden emplazarse en un animal transgénico. La célula hospedadora puede utilizarse como un receptor de vectores y puede incluir cualquier organismo transformable que tenga la capacidad de replicar un vector y/o expresar un ácido nucleico heterólogo codificado por un vector.

Una "composición" pretende significar una combinación de un agente activo y otro compuesto o composición que puede ser inerte (por ejemplo, un marcador) o activo, tal como un adyuvante.

Como se define en el presente documento, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la invención son bien conocidos para los expertos en la materia. Tales transportadores incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada, tampón fosfato, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones. Pueden añadirse otros diluyentes, adyuvantes y excipientes empleados de forma convencional, en conformidad con las técnicas convencionales. Tales transportadores pueden incluir etanol, polioles y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. También pueden emplearse tampones y agentes para el ajuste del pH. Los tampones incluyen, pero sin limitación, sales preparadas a partir de una base o ácido orgánico. Los tampones representativos incluyen, pero sin limitación, sales ácidas orgánicas, tales como sales de ácido cítrico, por ejemplo, citratos, ácido ascórbico, ácido glucónico, histidina-HCl, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trimetilamina o tampones fosfato. Los transportadores parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa, trehalosa, sacarosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites no volátiles. Los transportadores intravenosos pueden incluir reforzadores fluidos y nutritivos, reforzadores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden proporcionarse en los transportadores farmacéuticos conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes microbianos, antioxidantes, quelantes (por ejemplo, EDTA), gases inertes y similares. La presente invención no está limitada por la selección del transportador. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables, a partir de los componentes descritos anteriormente, que tienen isotonicidad, pH, estabilidad y otras características convencionales apropiadas, están dentro de la habilidad en la técnica. Véase, por ejemplo, textos tales como: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed, Lippincott Williams & Wilkins, publ., 2000 y The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4^a ed., eds. R. C. Rowe y col., APhA Publications, 2003.

La expresión "sustitución de aminoácido conservativa" indica cualquier sustitución de aminoácido para un dado resto de aminoácido, en donde el resto sustituto es tan químicamente similar al tal resto, que no da como resultado la disminución sustancial de la función del polipéptido (por ejemplo, actividad enzimática). Las sustituciones de aminoácido conservativas se conocen comúnmente en la técnica y los ejemplos de las mismas se describen en, por ejemplo, las Patente de Estados Unidos N.º 6.790.639, 6.774.107, 6.194.167 o 5.350.576. En una realización preferente, una sustitución de aminoácido conservativa será una cualquiera que se produzca dentro de uno de los siguientes seis grupos

- 1. Restos alifáticos pequeños, sustancialmente no polares: Ala, Gly, Pro, Ser y Thr;
- 2. Restos alifáticos grandes, no polares: Ile, Leu y Val; Met;
- 3. Restos polares cargados de forma negativa y sus amidas: Asp y Glu;
- 4. Amidas de restos polares cargados de forma negativa: Asn y Gln; His;
- 5. Restos polares, cargados de forma positiva: Arg y Lys; His; y
- 6. Restos aromáticos grandes: Trp y Tyr; Phe.

En una realización preferente, una sustitución de aminoácido conservativa será una cualquiera de las siguientes, que están enumeradas como parejas de Restos Nativos (Sustituciones Conservativas): Ala (Ser); Arg (Lys); Asn (Gln; His); Asp (Glu); Gln (Asn); Glu (Asp); Gly (Pro); His (Asn; Gln); Ile (Leu; Val); Leu (Ile; Val); Lys (Arg; Gln; Glu); Met (Leu; Ile); Phe (Met; Leu; Tyr); Ser (Thr); Thr (Ser); Trp (Tyr); Tyr (Trp; Phe) y Val (Ile; Leu).

Al igual que un polipéptido puede contener una sustitución (o sustituciones) de aminoácido conservativa, un polinucleótido del presente documento puede contener una sustitución (o sustituciones) de codones conservativas. Una sustitución de codón se considera conservativa sí, cuando se expresa, produce una sustitución de aminoácido conservativa, como se describe anteriormente. La sustitución de codón degenerada, la cual no da como resultado una sustitución de aminoácido, también es útil en los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado útil en una realización de la presente invención puede mutarse mediante una sustitución de codón degenerada para aproximarse a la frecuencia de uso de codones presentada por una célula hospedadora de expresión a transformar con dicho polinucleótido, o para mejorar de otra forma la expresión del mismo.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que la presente invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos, etc., particulares descritos en el presente documento y que, como tal, pueden variar.

A menos que se defina de otra forma, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con los anticuerpos descritos en el presente documento tendrán los significados que un experto en la materia entiende comúnmente. Además, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, células y cultivo celulares, biología molecular, proteínas y la química e hibridación de oligo- o polinucleótidos, descritas en el presente documento, son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica.

Para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo de tejidos y transfección, se utilizan técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes o como se llevan a cabo comúnmente en la técnica, o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan en general de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten en toda la presente memoria descriptiva, véase, por ejemplo, Sambrook y col. MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (3ª ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) y Ausubel y col. Current Protocols in Molecular Biology (New York: Greene Publishing Association/Wiley Interscience), 1993. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, la química analítica, química orgánica sintética y química de medicamentos y farmacéutica, descritas en el presente documento, son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas convencionales se utilizan para la síntesis química, el análisis químico, la preparación farmacéutica, la formulación y suministro, y el tratamiento de pacientes.

Excepto en los ejemplos operativos o cuando se indique otra cosa, todos los números que expresen cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales recombinantes y sus usos en procedimientos clínicos y científicos, incluyendo procedimientos de diagnóstico.

Con el advenimiento de los procedimientos de biología molecular y la tecnología recombinante, es posible producir anticuerpos y moléculas de tipo anticuerpo por medios recombinantes y, de este modo, generar secuencias génicas que codifican secuencias de aminoácidos específicas encontradas en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Tales anticuerpos pueden producirse ya sea clonando las secuencias génicas que codifican las cadenas polipeptídicas de dichos anticuerpos o mediante síntesis directa de dichas cadenas polipeptídicas, con el ensamblaje de las cadenas sintetizadas, para formar estructuras tetraméricas activas (H_2L_2) con afinidad por epitopos y determinantes antigénicos específicos. Esto ha permitido la producción fácil de anticuerpos que tienen características de secuencias de anticuerpos neutralizantes de distintas especies y fuentes.

Independientemente de la fuente de los anticuerpos o de cómo se construyen de forma recombinante, o de cómo se sintetizan, *in vitro* o *in vivo*, utilizando animales transgénicos, grandes cultivos celulares de tamaño de laboratorio o comercial, utilizando plantas transgénicas o mediante síntesis química directa empleando organismos no vivos en cualquier fase del procedimiento, todos los anticuerpos tienen una estructura tridimensional global similar. Esta estructura a menudo se proporciona como H_2L_2 y se refiere al hecho de que los anticuerpos comúnmente comprenden dos cadenas de aminoácidos ligeras (L) y dos cadenas de aminoácidos pesadas (H). Ambas cadenas tienen regiones que tienen la capacidad de interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Las regiones que interactúan con la diana se denominan como regiones "variables" o "V", y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de distinta actividad antigénica. Las regiones variables de las cadenas H o L contienen las secuencias de aminoácidos que tienen la capacidad de unirse de forma específica a las dianas antigénicas.

La expresión "región de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo que contiene los restos de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad para el antígeno. La región de unión del anticuerpo incluye los restos de aminoácido de la "región marco conservada" necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno.

Dentro de las regiones variables de las cadenas H o L que proporcionan las regiones de unión a antígeno, hay secuencias más pequeñas llamadas "hipervariables" debido a su extrema variabilidad entre anticuerpos de distinta especificidad. Tales regiones hipervariables también se denominan como "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Estas regiones CDR suponen la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante antigénica particular.

Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha encontrado que los emplazamientos posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticas dentro de las regiones de las cadenas pesada y ligera variables tienen emplazamientos similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas pesada y ligera variables de todos los anticuerpos tienen tres regiones CDR, cada una no continua con la otra.

En todas las especies de mamífero los péptidos de anticuerpo contienen regiones constantes (es decir, altamente

conservadas) y variables, y dentro de las últimas, existen las CDR, y las denominadas "regiones marco conservadas" compuestas de secuencias de aminoácidos dentro de la región variable de la cadena pesada o ligera, pero fuera de las CDR.

5 Respecto al determinante antigénico reconocido por las regiones CDR del anticuerpo, este se denomina también "epítipo". En otras palabras, epítipo se refiere a la porción de cualquier molécula que tiene la capacidad de ser reconocida por, y de unirse a, un anticuerpo (la correspondiente región de unión al anticuerpo puede denominarse como un paratopo).

10 Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula a la que un anticuerpo tiene la capacidad de unirse, que adicionalmente tiene la capacidad de inducir que un animal produzca un anticuerpo que tenga la capacidad de unirse a un epítipo del antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica a la que se hace referencia anteriormente está destinada a indicar que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden evocar los otros antígenos.

15 El término "anticuerpo" pretende incluir tanto moléculas de inmunoglobulina intactas como porciones, fragmentos, péptidos y derivados de los mismos tales como, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fse, regiones CDR, paratopos o cualquier porción o secuencia peptídica del anticuerpo que tenga la capacidad de unirse a un antígeno o epítipo. Se dice que un anticuerpo tiene "la capacidad de unirse" a una molécula si tiene la capacidad de reaccionar de forma específica con la molécula para que, de este modo, la molécula se una al anticuerpo.

20 Anticuerpo también incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos heteroquiméricos o anticuerpos caninizados, así como fragmentos, porciones, regiones, péptidos o derivados de los mismos, proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como, pero sin limitación, escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Tales anticuerpos de la presente invención tienen la capacidad de unirse de forma específica a la IL-31 de perro. Los fragmentos o porciones de anticuerpo pueden carecer del fragmento Fc del anticuerpo intacto, eliminarse más rápidamente de la circulación y pueden tener una unión de tejido no específica menor que la de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo pueden producirse a partir de anticuerpos intactos utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante escisión enzimática con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Véase, por ejemplo, Wahl y col., 24 J. Nucl. Med. 316-25 (1983). Las porciones de anticuerpos pueden fabricarse mediante cualquiera de los procedimientos anteriores o pueden fabricarse expresando una porción de la molécula recombinante. Por ejemplo, la región (o regiones) CDR de un anticuerpo recombinante puede aislarse y subclonarse en el vector de expresión apropiado. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.680.053.

Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los clones 11E12, 34D03 y 19D07

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona nuevos anticuerpos monoclonales que se unen de forma específica a la IL-31 de perro. En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención se une a la IL-31 de perro e impide su unión a, y la activación de, su complejo correceptor que comprende el receptor de IL-31 A (RIL-31a) y el receptor específico de Oncostatina-M (ROsm o RIL-31b). Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se identifican en el presente documento como "11E12", "34D03" y "19D07", que se refiere al número asignado a su clon de hibridoma. En el presente documento, "11E12", "34D03" o "19D07" también se refiere a la porción del anticuerpo monoclonal, el paratopo o las CDR, que se unen de forma específica con un epítipo de la IL-31 identificado como 11 E12, 34D03 o 19D07, debido a su capacidad para unirse a los anticuerpos 11 E12, 34D03 o 19D07, respectivamente. Las varias formas recombinantes, quiméricas, heteroquiméricas y/o caninizadas de 11 E12, 34D03 y 19D07 descritas en el presente documento pueden denominarse mediante el mismo nombre.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que incluye al menos uno de los siguientes:

45 una región determinante de complementariedad (CDR)₁ de la cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
 una CDR₂ de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPDNIK (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
 50 una CDR₃ de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y
 55 una variante de las mismas que tengan una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR₁, CDR₂ o CDR₃.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que incluye al menos uno del siguiente grupo:

una cadena ligera variable (V_L) que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)₁ que tiene la secuencia de aminoácidos RASESDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11E12-VL-CDR1), KSSQSLNLSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);

5 una CDR₂ de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-CDR2);

una CDR₃ de la cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y

10 una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR₁, CDR₂ o CDR₃

15 En otras realizaciones adicionales, un anticuerpo que tenga al menos una de las CDR de la cadena ligera variable descritas anteriormente, puede incluir adicionalmente una de las siguientes CDR de la cadena pesada variable:

una región determinante de complementariedad (CDR)₁ de la cadena pesada variable que tenga la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);

20 una CDR₂ de la cadena pesada variable que tenga la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);

una CDR₃ de la cadena pesada variable que tenga la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWWGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y

25 una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR₁, CDR₂ o CDR₃.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede incluir al menos uno de los siguientes:

a) una cadena ligera variable que comprende

30 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMHWHYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPA
RFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVATYYCQQSNKDPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 19; MU-11 E12-VL),
DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESDNYGISFMHWHYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGVPD
RFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 20; CAN-11 E12-VL-cUn-
FW2),

35 DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESDNYGISFMHWFQQKPGQSPQLLIYRASNLESGVPD
RFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 21; CAN-11E12-VL-cUn-13),
DIVMSQSPSSLSVSAGDKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKQPWQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 22; MU-19D07-VL),
EIVMTQSPASLSLQEEKVTITCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTRESGV
PSRFSGSGSGTDFSTISSLEPEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 23; CAN-19D07-VL-
998-1),

40 DILLTQSPASLAVSLGQRAISCKASQSVSFAGTGLMHWHYQQKPGQPPKLLIYRASNLEAGVPT
RFSGSGSRTDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQSREYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 24; MU-34D03-VL) o
EIVMTQSPASLSLQEEKVTITCKASQSVSFAGTGLMHWHYQQKPGQAPKLLIYRASNLEAGVPS
RFSGSGSGTDFSTISSLEPEDVAVYYCQQSREYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25; CAN-34D03-VL-998-1);

45 b) una cadena pesada variable que comprende
QVQLQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFKYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGGTKYNE
TFKGKATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARGGTSVIRDAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 26; MU-
11 E12-VH),

50 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYTFKYDINWVRQAPGAGLDWMGWIFPGDGGTKYN
ETFKGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCARGGTSVIRDAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 27; CAN-
-11E12-VH-415-1),

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFASFSSYDMSWVRQIPEKRELVATITSGGGYTYSADS
VKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDAVYYCARQNWVGLAYWGQGTSTVTVSA (SEQ ID NO: 28; MU-19D07-
-VH),

55 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLQWVATITSGGGYTYS
DSVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDAVYYCARQNWVGLAYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 29; CAN-
19D07-VH-400-1),

60 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFSSNYGMSWVRQTPDKRELVATISYGGSYTYYPD
NIKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 30; MU-
34D03-VH) o

EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSNYGMSWVRQAPGKGLQWVATISYGGSYTYYP
DNIKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 31; CAN-
34D03-VH-568-1); y

c) variantes de las mismas que tengan una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

En otras realizaciones, la invención proporciona una célula hospedadora que produce un anticuerpo descrito anteriormente.

5 La presente invención también incluye, dentro de su ámbito, secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo descrito anteriormente, que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti IL-31 de la presente invención. Además, también está incluida dentro del ámbito de la invención cualquier secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia de aminoácidos de 11 E12, 34D03 o 19D07, o péptidos de las mismas.

10 En algunas realizaciones, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito anteriormente, que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de los siguientes:

una región determinante de complementariedad (CDR)1 de la cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);

15 una CDR2 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);

20 una CDR3 de la cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11E12-VH-CDR3), ARQNWVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y

una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

25 En realizaciones adicionales, el ácido nucleico aislado descrito anteriormente puede incluir adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos uno de los siguientes:

una cadena ligera variable (V_L) que comprende una determinante de complementariedad (CDR) 1 que tenga la secuencia de aminoácidos RASESVDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11E12-VL-CDR1), KSSQSLNNSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);

30 una CDR2 de la cadena ligera variable que tenga la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-CDR2);

una CDR3 de la cadena ligera variable que tenga la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y

35 una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.

La presente invención proporciona adicionalmente un vector que incluye al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

40 Debido a que el código genético es degenerado, puede utilizarse más de un codón para codificar un aminoácido particular. Utilizando el código genético, pueden identificarse una o más secuencias de nucleótidos distintas, cada una de las cuales tendría la capacidad de codificar al aminoácido. La probabilidad de que un oligonucleótido particular constituya, de hecho, la secuencia codificante de XXX real puede estimarse considerando las relaciones de emparejamiento de bases anómalas y la frecuencia con la que un codón particular realmente se utiliza (para codificar un aminoácido particular) en células eucariotas o procariotas que expresan un anticuerpo anti IL-31, una o porción. Tales "reglas de utilización de codones" se desvelan en Lathe, y col., 183 J. Molec. Biol. 1-12 (1985). Utilizando las "reglas de utilización de codones" de Lathe, puede identificarse una única secuencia de nucleótidos, o un conjunto de secuencias de nucleótidos, que contenga una secuencia de nucleótidos teóricamente "más probable" que tenga la capacidad de codificar las secuencias anti IL-31. También se pretende que las regiones que codifican el anticuerpo para su uso en la presente invención puedan proporcionarse también alterando los genes de anticuerpo existentes, utilizando técnicas de biología molecular convencionales que den como resultado variantes (agonistas) de los anticuerpos y de los péptidos descritos en el presente documento. Tales variantes incluyen, pero sin limitación, delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos o péptidos anti IL-31.

55 Por ejemplo, una clase de sustituciones son las sustituciones de aminoácido conservativas. Tales sustituciones son las que sustituyen un aminoácido dado en un péptido de anticuerpo anti IL-31 por otro aminoácido de características similares. Normalmente se ven como sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los restos hidroxilo de Ser y Thr, el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los restos amida Asn y Gln, el intercambio de los restos básicos Lys y Arg, el reemplazo entre los restos aromáticos Phe, Tyr y similares. Las directrices respecto a qué cambios de aminoácido son probablemente fenotípicamente silenciosos se encuentra en Bowie y col., 247 Science 1306-10 (1990).

Los anticuerpos o péptidos anti IL-31 variantes o agonistas pueden ser totalmente funcionales o pueden carecer de función de una o más actividades. Las variantes totalmente funcionales contienen normalmente solo variaciones conservativas o variaciones en restos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes funcionales también pueden contener sustituciones de aminoácidos similares que no dan como resultado un cambio de función o dan como resultado uno insignificante. Como alternativa, tales sustituciones pueden afectar en algún grado la función, de forma positiva o negativa. Las variantes no funcionales normalmente contienen una o más sustituciones, deleciones, inserciones, inversiones o truncamientos de aminoácido no conservativos, o una sustitución, inserción, inversión o deleción en un resto crítico o región crítica.

Los aminoácidos que son esenciales para la función pueden identificarse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis mediante alanina. Cunningham y col., 244 Science 1081-85 (1989). El último procedimiento introduce mutaciones de alaninas únicas en cada resto de la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se analizan después por su actividad biológica, tal como la unión al epítipo o la actividad ADCC *in vitro*. Los sitios que son críticos para la unión ligando-receptor también pueden determinarse mediante análisis estructural, tal como cristalografía, resonancia magnética nuclear o marcaje por fotoafinidad. Smith y col., 224 J. Mol. Biol. 899-904 (1992); de Vos y col., 255 Science 306-12 (1992).

Además, los polipéptidos a menudo contienen aminoácidos distintos de los veinte aminoácidos de "origen natural". Adicionalmente, muchos aminoácidos, que incluyen los aminoácidos terminales, pueden modificarse por procesos naturales, tales como el procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, o por técnicas de modificación química bien conocidas en la técnica. Las modificaciones conocidas incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, la unión covalente de flavina, la unión covalente de un grupo funcional heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, la unión covalente de fosfatidilinositol, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteínas, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación *gamma*, glucosilación, formación de anclajes por GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos a proteínas, mediada por ARN de transferencia, tales como arginilación y ubiquitinación.

Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia y se han descrito con gran detalle en la literatura científica. En textos más básicos, tales como Proteins--Structure and Molecular Properties (2ª ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Co., NY, 1993), se describen varias modificaciones particularmente comunes, por ejemplo, glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, carboxilación *gamma* de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP. En esta materia están disponibles muchas revisiones detalladas, tales como la de Wold, Posttranslational Covalent Modification of proteins, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, NY, 1983); Seifter y col. 182 Meth. Enzymol. 626-46 (1990) y Rattan y col. 663 Ann. NY Acad. Sci. 48-62 (1992).

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención también abarcan derivados o análogos en los que un resto de aminoácido sustituido no es uno codificado por el código genético.

De forma similar, las adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos, así como las variaciones y modificaciones recién descritas, pueden ser igualmente aplicables a la secuencia de aminoácidos del antígeno y/o epítipo de la IL-31, o péptidos de los mismos. Como se menciona anteriormente, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención son específicamente efectivos en el reconocimiento de la IL-31.

Derivados de anticuerpo

Están incluidos en el ámbito de la presente invención los derivados de anticuerpo. Un "derivado" de un anticuerpo contiene grupos funcionales químicos adicionales que normalmente no son parte de la proteína. Las modificaciones covalentes de la proteína están incluidas en el ámbito de la presente invención. Tales modificaciones pueden introducirse en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácido del anticuerpo que se tienen como objetivo con un agente de derivatización orgánico que tenga la capacidad de reaccionar con las cadenas laterales o restos terminales seleccionados. Por ejemplo, la derivatización con agentes bifuncionales, bien conocida en la técnica, es útil para el entrecruzamiento del anticuerpo, o un fragmento, con una matriz de soporte insoluble en agua o con otros soportes macromoleculares.

Los derivados también incluyen anticuerpos monoclonales que están marcados de forma radioactiva. Por ejemplo, con yodo radioactivo C²⁵¹, ¹³¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), indio (¹¹¹In), tritio (³H) o similar; conjugados de anticuerpos monoclonales con biotina o avidina, con enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, *beta*-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucoamilasa, anhidrasa de ácido carboxílico, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, y también conjugados de anticuerpos monoclonales con agentes bioluminiscentes (tales como luciferasa), agentes quimioluminiscentes (tales como ésteres de acridina) o agentes fluorescentes (tales como fibobiliproteínas).

Otro derivado de anticuerpo bifuncional de la presente invención es un anticuerpo biespecífico, generado combinando partes de dos anticuerpos distintos que reconocen dos grupos antigénicos distintos. Esto puede

lograrse mediante entrecruzamiento o técnicas recombinantes. De forma adicional, pueden añadirse grupos funcionales al anticuerpo o a una porción del mismo, para aumentar la semivida *in vivo* (por ejemplo, prolongando el tiempo de eliminación de la circulación sanguínea). Tales técnicas incluyen, por ejemplo, añadir grupos funcionales PEG (también denominado pegilación) y son bien conocidos en la técnica. Véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º de Publicación 20030031671.

Expresión recombinante de anticuerpos

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal objeto se introducen de forma directa en una célula hospedadora, y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la expresión del anticuerpo codificado. Después de que se hayan introducido en una célula los ácidos nucleicos objeto, normalmente la célula se incuba, habitualmente a 37 °C, en ocasiones bajo selección, durante un periodo de aproximadamente 1-24 horas, para permitir la expresión del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo se secreta en el sobrenadante del medio en el que crece la célula.

Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales se han producido como moléculas nativas en líneas de hibridoma murinas. Además de esa tecnología, la presente invención proporciona la expresión de ADN recombinante de anticuerpos monoclonales. Esto permite la producción de anticuerpos caninizados, así como de un espectro de derivados de anticuerpo y de proteínas de fusión, en una especie hospedadora de elección.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo anti IL-31 de la presente invención puede recombinarse con un ADN de vector en conformidad con técnicas convencionales, que incluyen hacer romos o cohesivos los extremos para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y el ligamiento con ligasas apropiadas. Las técnicas para tales manipulaciones se desvelan, por ejemplo, en Maniatis y col., MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 y 1989) y Ausubel y col. 1993, citado anteriormente, y pueden utilizarse para construir secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal o región de unión a antígeno de la misma.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se dice que tiene la “capacidad de expresar” un polipéptido si contiene secuencias de nucleótidos que contienen información reguladora transcripcional y traduccional, y tales secuencias están “unidas operativamente” a las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la que las secuencias de ADN regulatorio y las secuencias de ADN que se pretende expresar están conectadas de tal modo que permita la expresión génica como péptidos o porciones de anticuerpo anti IL-31, en cantidades recuperables. La naturaleza precisa de las regiones regulatorias necesarias para la expresión génica puede variar de organismo a organismo, como se sabe bien en la técnica análoga. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, citado anteriormente; Ausubel y col., 1993, citado anteriormente.

La presente invención, por consiguiente, abarca la expresión de un anticuerpo anti IL-31 en células procariotas o eucariotas. Los hospedadores adecuados incluyen hospedadores bacterianos o eucariotas, que incluyen bacterias, levaduras, insectos, hongos, aves y células de mamífero, ya sea *in vivo* o *in situ*, o células hospedadoras de origen de mamífero, insecto, ave o levaduras. Las células o tejidos de mamífero pueden ser de origen humano, de primate, hámster, conejo, roedor, vaca, cerdo, oveja, caballo, cabra, perro o gato, pero puede utilizarse cualquier otra célula de mamífero.

En una realización, la secuencia de nucleótidos introducida se incorporará en un plásmido o vector vírico que tenga capacidad de replicación autónoma en el hospedador receptor. Para este fin puede emplearse cualquiera de una amplia diversidad de vectores. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., 1993, citado anteriormente. Los factores de importancia en la selección de un plásmido o vector vírico particular incluyen: la facilidad con que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de las células receptoras que no contienen el vector; la cantidad de copias del vector que se desea en un hospedador particular y si es conveniente tener la capacidad de “transferir” el vector entre células hospedadoras de distinta especie.

Los ejemplos de vectores procariotas conocidos en la técnica incluyen plásmidos, tales como los que tienen la capacidad de replicación en *E. coli* (tales como, por ejemplo, pBR322, ColE1, pSC101, pACYC 184, .pi.VX). Tales plásmidos se desvelan, por ejemplo, en Maniatis y col., 1989, citado anteriormente; Ausubel y col. 1993, citado anteriormente. Los plásmidos de *Bacillus* incluyen pC194, pC221, pT127, etc. Tales plásmidos se desvelan en Gryczan, en THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982). Los plásmidos de *Streptomyces* adecuados incluyen pIJ101 (Kendall y col., 169 J. Bacteriol. 4177-83 (1987)) y bacteriófagos de *Streptomyces* tales como phi.C31 (Chater y col., en SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kaido, Budapest, Hungría 1986)). Los plásmidos de pseudomonas se revisan en John y col., 8 Rev. Infect. Dis. 693-704 (1986); Izaki, 33 Jpn. J. Bacteriol. 729-42 (1978); y Ausubel y col., 1993, citado anteriormente.

Como alternativa, los elementos de expresión génica útiles para la expresión de ADNc que codifica anticuerpos o péptidos anti IL-31 incluyen, pero sin limitación, (a) promotores víricos de la transcripción y sus elementos potenciadores, tales como el promotor temprano de SV40 (Okayama y col., 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)), el LTR del virus de sarcoma de Rous (Gorman y col., 79 Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU. 6777 (1982)) y el LTR del virus de la

leucemia murina de Moloney (Grosschedl y col., 41 Cell 885 (1985)); (b) regiones de corte y empalme y sitios de poliadenilación tales como los obtenidos de la región tardía del SV40 (Okayama y col., 1983) y (c) sitios de poliadenilación tales como del SV40 (Okayama y col., 1983).

5 Los genes del ADNc de inmunoglobulina pueden expresarse como se describe en Weidle y col., 51 Gene 21 (1987), utilizando como elementos de expresión el promotor temprano del SV40 y su potenciador, los potenciadores del promotor de la cadena H de inmunoglobulina de ratón, el corte y empalme de ARNm de la región tardía del SV40, la secuencia intermedia de la S-globina de conejo, los sitios de poliadenilación de inmunoglobulina y de la S-globina de conejo, y los elementos de poliadenilación del SV40.

10 Para los genes de inmunoglobulina compuestos de parte de ADNc, parte de ADN genómico (Whittle y col., 1 Protein Engin. 499 (1987)), el promotor transcripcional puede ser el citomegalovirus humano y los potenciadores de promotor pueden ser de citomegalovirus y de inmunoglobulina de ratón/ser humano, y las regiones de poliadenilación y de corte y empalme de ARNm pueden ser las secuencias de inmunoglobulina cromosómicas nativas.

15 En una realización, para la expresión de genes de ADNc en células de roedor, el promotor transcripcional es una secuencia de LTR vírico, los potenciadores transcripcionales de promotores son cualquiera o ambos del potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón o el potenciador del LTR vírico, la región de corte y empalme contiene un intrón de más de 31 pb y las regiones de poliadenilación y de terminación de la transcripción se obtienen de la secuencia cromosómica nativa que corresponde a la cadena de inmunoglobulina que se sintetiza. En otras realizaciones, las secuencias de ADNc que codifican otras proteínas se combinan con los elementos de expresión
20 enumerados anteriormente para lograr la expresión de las proteínas en células de mamífero.

Cada gen fusionado puede ensamblarse o insertarse en un vector de expresión. Las células receptoras que tienen la capacidad de expresar el producto del gen de la cadena de inmunoglobulina quimérica se transfectan después de forma individual con un gen que codifica un péptido anti IL-31 o una cadena H quimérica o L quimérica, o se
25 cotransfectan con un gen de la cadena H quimérica y uno de la L quimérica. Las células receptoras transfectadas se cultivan en condiciones que permiten la expresión de los genes incorporados, y las cadenas de inmunoglobulina expresadas o anticuerpos intactos o fragmentos se recuperan del cultivo.

En una realización, los genes fusionados que codifican el péptido anti IL-31 o las cadenas H y L quiméricas, o porciones de los mismos, se ensamblan en vectores de expresión distintos que se usan después para cotransfectar una célula receptora. Como alternativa, los genes fusionados que codifican las cadenas H y L quiméricas pueden
30 ensamblarse en el mismo vector de expresión.

Para la transfección de los vectores de expresión y la producción del anticuerpo quimérico, la línea celular receptora puede ser una célula de mieloma. Las células de mieloma pueden sintetizar, ensamblar y secretar inmunoglobulinas codificadas por los genes de inmunoglobulina transfectados, y poseen el mecanismo para la glucosilación de la
35 inmunoglobulina. Las células de mieloma pueden cultivarse en cultivo o en la cavidad peritoneal de un ratón, en donde la inmunoglobulina secretada puede obtenerse del líquido ascítico. Otras células receptoras adecuadas incluyen células linfoides tales como linfocitos B de origen humano o no humano, células de hibridoma de origen humano o no humano, o células de heterohibridoma interespecies.

El vector de expresión que porta una construcción de anticuerpo quimérico o caninizado, o polipéptido anti IL-31 de la presente invención, puede introducirse en una célula hospedadora apropiada mediante cualquiera de una
40 diversidad de medios adecuados, que incluyen medios bioquímicos tales como la transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, precipitación por fosfato de calcio y aplicación con policones, tales como dietilaminoetil (DEAE) dextrano, y tales medios mecánicos como electroporación, microinyección directa y bombardeo de microproyectiles. Johnston y col., 240 Science 1538 (1988).

Las levaduras pueden proporcionar ventajas substanciales con respecto a las bacterias para la producción de las cadenas H y L de inmunoglobulina. Las levaduras llevan a cabo modificaciones peptídicas postraduccionales que
45 incluyen la glucosilación. Existen ahora varias estrategias del ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y plásmidos de alto número de copias, que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en levaduras. La levadura reconoce las secuencias líder de los productos génicos de mamífero clonados y secreta péptidos que portan secuencias líder (es decir, prepéptidos). Hitzman y col., 11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpelier, Francia, 1982).

En los sistemas de expresión génica en levadura pueden evaluarse de forma rutinaria los niveles de producción, secreción y la estabilidad de los péptidos, el anticuerpo y los anticuerpos ensamblados murinos y quiméricos, heteroquiméricos, caninizados o felinizados anti IL-31, y fragmentos y regiones de los mismos. Pueden utilizarse
55 cualquiera de una serie de sistemas de expresión génica en levadura que incorporan elementos promotores y de terminación de genes expresados de forma activa, que codifican enzimas glucolíticas producidas en grandes cantidades cuando las levaduras se crecen en medios ricos en glucosa. Los genes glucolíticos conocidos pueden también proporcionar señales muy eficaces de control de la transcripción. Por ejemplo, pueden utilizarse las señales promotoras y terminadoras del gel de la fosfoglicerato quinasa (PGK). Pueden utilizarse varias estrategias para

evaluar plásmidos de expresión óptima para la expresión en levadura de los ADNc de inmunoglobulina clonados. Véase Vol. II DNA Cloning, 45-66, (Glover, ed.) IRL Press, Oxford, RU 1985).

5 También pueden utilizarse cepas bacterianas como hospedadoras para la producción de las moléculas de anticuerpo o péptidos descritos en la presente invención. Los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se obtienen de especies compatibles con una célula hospedadora se utilizan en relación a estos hospedadores bacterianos. El vector porta un sitio de replicación, así como genes específicos que tienen la capacidad de proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Pueden utilizarse varias estrategias para evaluar los plásmidos de expresión para la producción de anticuerpos murinos, quiméricos, heteroquiméricos, caninizados o felinizados, fragmentos y regiones o cadenas de anticuerpo codificados por los ADNc de
10 inmunoglobulinas clonados en bacterias (véase Glover, 1985, citado anteriormente; Ausubel, 1993, citado anteriormente; Sambrook, 2001, citado anteriormente; Colligan y col., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, NY, NY (1994-2001); Colligan y col., eds. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001)).

15 Las células de mamífero hospedadoras pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Las células de mamífero proporcionan modificaciones postraduccionales a las moléculas proteicas de inmunoglobulina, que incluyen la eliminación del péptido líder, el plegamiento y el ensamblaje de las cadenas H y L, la glucosilación de las moléculas de anticuerpo y la secreción de la proteína de anticuerpo funcional.

20 Las células de mamífero que pueden ser útiles como hospedadores para la producción de proteínas de anticuerpo, además de las células de origen linfóide descritas anteriormente, incluyen células de origen fibroblástico, tales como las células Vero (ATCC CRL 81) o CHO-K1 (ATCC CRL 61).

Están disponibles muchos sistemas de vector para la expresión en células de mamífero de genes clonados de las cadenas H y L de los péptidos anti IL-31 (véase Glover, 1985, citado anteriormente). Pueden seguirse distintas estrategias para obtener anticuerpos H₂L₂ completos. Es posible coexpresar las cadenas H y L en las mismas células para lograr la asociación intracelular y la unión de las cadenas H y L en anticuerpos H₂L₂ tetraméricos
25 completos y/o péptidos anti IL-31. La coexpresión puede producirse utilizando los mismos o distintos plásmidos en el mismo hospedador. Los genes para las cadenas H y L y/o los péptidos anti IL-31 pueden colocarse en el mismo plásmido, que después se transfecta en células, seleccionando de esta forma directamente a células que expresan ambas cadenas. Como alternativa, las células pueden transfectarse en primer lugar con un plásmido que codifica una cadena, por ejemplo la cadena L, seguido de la transfección de la línea celular resultante con un plásmido de la cadena H que contiene un segundo marcador de selección. Las líneas celulares que producen péptidos anti IL-31
30 y/o moléculas H₂L₂ a través de cualquier ruta, podrían transfectarse con plásmidos que codifican copias adicionales de péptidos, cadenas H, L, o H más L, junto con marcadores de selección adicionales, para generar líneas celulares con propiedades potenciadas, tales como una producción más alta de moléculas de anticuerpo H₂L₂ ensambladas o una estabilidad potenciada de las líneas celulares transfectadas.

35 Para una producción de anticuerpos recombinantes prolongada y de alto rendimiento, puede utilizarse expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse técnicamente líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes víricos de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con casetes de expresión de inmunoglobulinas y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN ajeno, se puede permitir que las células técnicamente diseñadas crezcan durante 1-2 días en medio enriquecido y después se cambian a un medio de selección. El marcador de selección del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar el plásmido de forma estable en un cromosoma y crecer para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Tales líneas celulares técnicamente diseñadas pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos/componentes que interactúan de forma directa o indirecta con la molécula de anticuerpo.

45 Una vez que se ha producido un anticuerpo de la invención este puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, en particular de afinidad para el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. En muchas realizaciones los anticuerpos se secretan de la célula al medio de cultivo y se recogen del medio de cultivo.
50

Aplicaciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti IL-31 de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones pruriginosas y/o alérgicas en perros. De forma más concreta, la invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, como principio activo, un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, heteroquimérico o caninizado de acuerdo con la presente invención. También se prevén las inmunoglobulinas intactas o sus fragmentos de unión, tales como Fab. El anticuerpo y las composiciones farmacéuticas del mismo, de la presente invención, son útiles para la administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, vía intramuscular o vía intravenosa.
55

Los anticuerpos anti IL-31 de la presente invención pueden administrarse ya sea como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Pueden administrarse solos, pero en general se administran con un transportador farmacéutico seleccionado basándose en la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional.

5 La administración de los anticuerpos desvelados en el presente documento puede llevarse a cabo mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la inyección parenteral (tal como inyección intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), por vía oral o mediante administración tópica de los anticuerpos (normalmente portados en una formulación farmacéutica) a una superficie de las vías respiratorias. La administración tópica en la superficie de las
10 vías respiratorias puede llevarse a cabo mediante administración intranasal (por ejemplo, mediante el uso de un cuentagotas, hisopo o inhalador). La administración tópica de los anticuerpos a la superficie de las vías respiratorias también puede llevarse a cabo mediante la administración por inhalación, tal como creando partículas respirables de una formulación farmacéutica (incluyendo partículas tanto sólidas como líquidas) que contienen los anticuerpos como una suspensión en aerosol, y después provocando que el sujeto inhale las partículas respirables. Los procedimientos y el aparato para la administración de partículas respirables de formulaciones farmacéuticas son bien conocidos y puede emplearse cualquier técnica convencional. La administración oral puede ser, por ejemplo, en
15 forma de un líquido o formulación sólida que se pueda ingerir.

En algunas realizaciones deseadas, los anticuerpos se administran mediante inyección parenteral. Para la administración parenteral, los anticuerpos o péptidos anti IL-31 se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado, en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el
20 vehículo puede ser una solución del anticuerpo, o un cóctel del mismo, disuelto en un transportador aceptable, tal como un transportador acuoso; tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, trehalosa o solución de sacarosa, o seroalbúmina al 5 %, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 % y similares. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. Estas soluciones son estériles y, en general, libres de materia particulada. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se necesite, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como
25 agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo desde menos de aproximadamente el 0,5 %, habitualmente a o al menos aproximadamente el 1 % hasta tanto como el 15 % o el 20 % en peso, y se seleccionará principalmente a base del volumen de los fluidos, las viscosidades, etc., en conformidad con el modo particular de administración seleccionado. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas utilizadas comúnmente.

35 Los procedimientos reales para la preparación de composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos u obvios para los expertos en la materia y se describen con más detalle en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMA. SCI. (15ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980).

Los anticuerpos de la presente invención pueden liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un transportador adecuado antes del uso. Esta técnica ha mostrado ser eficaz con las inmunoglobulinas convencionales. Puede emplearse cualquier técnica de liofilización y reconstitución adecuada. El experto en la materia apreciará que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse para compensarlo.

Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para la prevención de la recurrencia y/o los tratamientos terapéuticos para enfermedades existentes. Los transportadores farmacéuticos adecuados se describen en la edición más reciente de REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, como texto de referencia convencional en este campo de la técnica.

En la aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un sujeto que ya padece de una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener o aliviar de forma parcial, la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del sujeto, pero en general varía de aproximadamente 0,1 mg de anticuerpo por kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg de anticuerpo por kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 0,3 mg de anticuerpo por kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg de anticuerpo por kg de peso corporal. A la vista de la minimización de las sustancias extrañas y de la menor probabilidad de rechazos de "sustancias ajenas" que se logra mediante el tipo canino de la presente invención, puede ser posible administrar excesos sustanciales de estos anticuerpos.

La dosificación administrada variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; la edad, salud y peso del receptor; la naturaleza y grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

Como ejemplo no limitativo, el tratamiento de patologías relacionadas con la IL-31 en perros puede proporcionarse como una dosificación bisemanal o mensual de los anticuerpos anti IL-31 de la presente invención, en el intervalo de dosificación descrito anteriormente.

5 Los ejemplos de anticuerpos para el uso terapéutico en perros son anticuerpos de alta afinidad (estos también pueden ser de alta avidéz), y fragmentos, regiones y derivados de los mismos, que tengan potente actividad anti IL-31 *in vivo*, de acuerdo con la presente invención.

La administración única o múltiple de las composiciones puede llevarse a cabo con niveles de dosis y un régimen que selecciona el veterinario responsable. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad del anticuerpo (o anticuerpos) de la presente invención suficiente para tratar de forma eficaz al sujeto.

10 Aplicaciones diagnósticas

La presente invención también proporciona los anticuerpos anti IL-31 anteriores para su uso en procedimientos de diagnóstico para la detección de la IL-31 en animales de compañía de los que se sabe, o se sospecha, que tienen una afección pruriginosa y/o alérgica.

15 Los anticuerpos anti IL-31 de la presente invención son útiles para inmunoensayos que detectan o cuantifican en una muestra a la IL-31 o anticuerpos anti IL-31. Un inmunoensayo para la IL-31 normalmente comprende incubar una muestra clínica o biológica en presencia de un anticuerpo o polipéptido anti IL-31 de alta afinidad (o alta avidéz) marcado de forma detectable de la presente invención, que tiene la capacidad de unirse de forma selectiva a IL-31, y detectar en una muestra el péptido o anticuerpo marcado que está unido. Son conocidos en la técnica diversos procedimientos de ensayos clínicos. Véase, por ejemplo, IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S (Voller y col., eds., Univ. Park, 1981). Tales muestras incluyen muestras de biopsia de tejido, de sangre, de suero y fecales, o líquidos recogidos de sujetos animales y sometidos a análisis por ELISA, como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, la unión del antígeno al anticuerpo se detecta sin el uso de un soporte sólido. Por ejemplo, la unión del antígeno al anticuerpo puede detectarse en un formato líquido.

25 En otras realizaciones, un anticuerpo o polipéptido anti IL-31 puede, por ejemplo, fijarse a nitrocelulosa u otro soporte sólido que tenga la capacidad de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. Después, el soporte puede lavarse con tampones adecuados, seguido del tratamiento con el péptido o anticuerpo específico para la IL-31 marcado de forma detectable. Después, el soporte en fase sólida puede lavarse con el tampón una segunda vez para retirar el péptido o anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido en el soporte sólido puede detectarse después mediante etapas de un procedimiento conocido.

30 "Soporte en fase sólida " o "portador" se refiere a cualquier soporte que tenga la capacidad de unir péptido, antígeno o anticuerpo. Los soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno (PVDF), dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble en alguna medida o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre y cuando la molécula acoplada tenga la capacidad de unirse a la IL-31 o a un anticuerpo anti IL-31. Por lo tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, placa de cultivo, tira de ensayo, etc. Por ejemplo, los soportes pueden incluir perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán mucho otros portadores adecuados para la unión de anticuerpo, péptido o antígeno, o pueden determinarlos mediante experimentación rutinaria.

Etapas de procedimiento bien conocidas pueden determinar la actividad de unión de un dado lote de péptido y/o anticuerpo anti IL-31. Los expertos en la materia pueden determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas mediante experimentación rutinaria.

45 El marcaje de forma detectable de un péptido y/o anticuerpo específico para la IL-31 puede llevarse a cabo mediante la unión a una enzima, para el uso en un inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La enzima unida reacciona con el sustrato expuesto para generar un grupo funcional químico que puede detectarse, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden utilizarse para marcar de forma detectable los anticuerpos específicos para la IL-31 de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la malato deshidrogenasa, la nucleasa estafilocócica, la delta-5-esteroide isomerasa, la alcohol deshidrogenasa de levadura, la alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, la triosa fosfato isomerasa, la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la asparraginasa, la glucosa oxidasa, la beta galactosidasa, la ribonucleasa, la ureasa, la catalasa, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la glucoamilasa y la acetilcolinesterasa.

55 Marcando de forma radioactiva los anticuerpos específicos para la IL-31 es posible detectar a la IL-31 a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA). Véase Work y col., LAB. TECHNIQUES & BIOCHEM. 1 N MOLEC. Bio. (No. Holland Pub. Co., NY, 1978). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo, o mediante autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el fin de la presente invención incluyen: ³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C y ¹²⁵I.

También es posible marcar los anticuerpos específicos para la IL-31 con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado con fluorescencia se expone a la luz de la longitud de onda apropiada, entonces puede detectarse su presencia debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más comúnmente utilizados están el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la alofococianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.

Los anticuerpos específicos para la IL-31 también pueden marcarse de forma detectable utilizando metales que emiten fluorescencia tales como ^{125}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo específico para la IL-31 utilizando grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los anticuerpos específicos para la IL-31 también pueden marcarse de forma detectable mediante el acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado de forma quimioluminiscente se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente útiles son el luminol, el isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de ácido oxálico.

Asimismo, puede utilizarse un compuestos bioluminiscente para marcar el anticuerpo específico para la IL-31, o una porción, fragmento, polipéptido o derivado, de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrado en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para los fines de marcaje son la luciferina, la luciferasa y la aequorina.

La detección del anticuerpo específico para la IL-31, o de una porción, fragmento, polipéptido o derivado, puede llevarse a cabo mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si el marcador detectable es un emisor radiactivo gamma, o mediante un fluorímetro, por ejemplo, si el marcador es un material fluorescente. En el caso de un marcador enzimático, la detección puede llevarse a cabo mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también puede llevarse a cabo mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato, en comparación con patrones preparados de forma similar.

Para los fines de la presente invención, la IL-31 que se detecta mediante los ensayos anteriores puede estar presente en una muestra biológica. Puede utilizarse cualquier muestra que contenga IL-31. Por ejemplo, la muestra es un fluido biológico tal como, por ejemplo, sangre, suero, linfa, orina, heces, exudado inflamatorio, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, un extracto u homogeneizado de tejido, y similares. Sin embargo, la invención no se limita a ensayos que utilizan solo estas muestras, siendo posible para un experto en la materia, a la luz de la presente memoria descriptiva, determinar las condiciones adecuadas que permiten el uso de otras muestras.

La detección *in situ* puede llevarse a cabo extrayendo una muestra de ensayo histológica de un sujeto animal y proporcionando la combinación de anticuerpos marcados de la presente invención a tal muestra de ensayo. El anticuerpo (o porción del mismo) puede proporcionarse aplicando a, o cubriendo con el anticuerpo marcado (o porción), una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de la IL-31 sino también la distribución de la IL-31 en el tejido examinado. Utilizando la presente invención, los expertos en la materia perciben fácilmente que para lograr tal detección *in situ* puede modificarse cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos histológicos (tal como procedimientos de tinción).

El anticuerpo, fragmento o derivado de la presente invención puede adaptarse para la utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo de "dos sitios" o de "tipo sándwich". En un ensayo inmunométrico típico, se une una cantidad de anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) no marcado a un soporte sólido que es insoluble en el fluido que se está analizando y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado de forma detectable para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo en la fase sólida, el antígeno y el anticuerpo marcado.

Los anticuerpos pueden utilizarse para detectar de forma cuantitativa o cualitativa la IL-31 en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan la IL-31. Esto puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado de forma fluorescente (véase a continuación), acoplado con microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o detección fluorométrica. Para fines diagnósticos, los anticuerpos pueden estar marcados o no marcados. Los anticuerpos no marcados pueden utilizarse en combinación con otros anticuerpos marcados (segundos anticuerpos) que son reactivos con el anticuerpo, tal como anticuerpos específicos para las regiones constantes de la inmunoglobulina de canino. Como alternativa, los anticuerpos pueden marcarse de forma directa. Puede emplearse una amplia diversidad de marcadores, tales como radionúclidos, flúor, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (en particular haptenos), etc. Están disponibles, y son bien conocidos para los expertos en la materia, numerosos tipos de inmunoensayos, tales como los discutidos anteriormente.

En una realización, el procedimiento de diagnóstico para la detección de la IL-31 es una prueba de inmunoensayo de flujo lateral. Esto también se conoce como ensayo inmunocromatográfico, Rapid ImmunoMigration (RIM™) o tira

reactiva. Los inmunoensayos de flujo lateral son, esencialmente, inmunoensayos adaptados para funcionar a lo largo de un eje único, para ajustarse al formato de tira reactiva. Se han desarrollado como productos comerciales varias variaciones de la tecnología, pero todas funcionan de acuerdo con el mismo principio básico. Una tira reactiva típica consiste en los siguientes componentes: (1) capa de muestra - una capa absorbente sobre la que se aplica la muestra de ensayo; (2) capa de conjugado o reactivo - esta contiene anticuerpos específicos contra el analito diana, conjugados con partículas coloreadas (habitualmente partículas de oro coloidal o microesferas de látex); (3) membrana de reacción - normalmente una membrana de nitrocelulosa hidrófoba o de acetato de celulosa sobre la que se inmovilizan anticuerpos anti analito diana en una línea a través de la membrana, como zona de captura o línea de ensayo (también puede estar presente una zona de control que contiene anticuerpos específicos para los anticuerpos conjugados) y (4) un depósito de mecha o de desechos - una capa absorbente adicional diseñada para extraer la muestra a través de la membrana de reacción mediante capilaridad y recogerla. Los componentes de la tira habitualmente están fijados a un material de refuerzo inerte y pueden presentarse en un formato de varilla individual o dentro de una caja de plástico con un orificio para la muestra y una ventana de reacción que muestra las zonas de captura y de control.

Existen dos tipos principales de inmunoensayo de flujo lateral utilizados en análisis microbiológicos: los ensayos de tipo sándwich de doble anticuerpo y los ensayos competitivos. En el formato de tipo sándwich de doble anticuerpo, la muestra migra desde la capa de la muestra a través de la capa de conjugado, donde cualquier analito diana presente se unirá al conjugado. Después, la muestra continúa migrando a través de la membrana hasta que alcanza la zona de captura, donde el complejo diana/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados, produciendo una línea visible en la membrana. Después, la muestra migra más a lo largo de la tira hasta que alcanza la zona de control, donde el conjugado en exceso se unirá y producirá una segunda línea visible en la membrana. Esta línea de control indica que la muestra ha migrado a lo largo de la membrana, como se pretendía. Dos líneas claras en la membrana es un resultado positivo. Una única línea en la zona de control es un resultado negativo. Los ensayos competitivos difieren del formato de tipo sándwich de doble anticuerpo en que la capa de conjugado contiene anticuerpos que ya están unidos al analito diana, o a un análogo del mismo. Si el analito diana está presente en la muestra, este, por lo tanto, no se unirá con el conjugado y permanecerá no marcado. A medida que la muestra migra a lo largo de la membrana y alcanza la zona de captura, un exceso de analito no marcado se unirá a los anticuerpos inmovilizados y bloqueará la captura del conjugado, de forma que no se produce una línea visible. El conjugado no unido se unirá entonces a los anticuerpos en la zona de control, produciendo una línea de control visible. Una única línea de control en la membrana es un resultado positivo. Dos líneas visibles en las zonas de captura y de control es un resultado negativo. Sin embargo, si no está presente un exceso del analito diana no marcado, puede producirse una línea débil en la zona de captura, lo que indica un resultado no concluyente. Existen varias variaciones de la tecnología de flujo lateral. La zona de captura en la membrana puede contener antígenos o enzimas inmovilizados - dependiendo del analito diana - en lugar de anticuerpos. También es posible aplicar múltiples zonas de captura para crear una prueba multiplex. Por ejemplo, se han desarrollado tiras reactivas comerciales capaces de detectar las toxinas Shiga ST1 y ST2 de EHEC de forma separada en la misma muestra.

De manera importante, los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles en el diagnóstico de una afección pruriginosa y/o alérgica en perros o gatos. De forma más específica, el anticuerpo de la presente invención puede identificar la expresión aumentada de IL-31 en animales de compañía. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionar una herramienta inmunohistoquímica importante.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en matrices de anticuerpos, altamente adecuadas para medir perfiles de expresión génica.

Kits

También están incluidos en el ámbito de la presente invención kits para la práctica de los procedimientos objeto. Los kits incluyen al menos uno o más anticuerpos de la presente invención, un ácido nucleico que codifica a los mismos o una célula que contiene a los mismos. En una realización, puede proporcionarse un anticuerpo de la presente invención, habitualmente en forma liofilizada, en un recipiente. Los anticuerpos, que pueden estar conjugados a un marcador o toxina, o no estar conjugados, se incluyen normalmente en los kits con tampones, tales como Tris, fosfato, carbonato, etc., estabilizantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, seroalbúmina o similares. En general, estos materiales estarán presentes en menos del 5 % en peso, a base de la cantidad de anticuerpo activo, y habitualmente estarán presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente el 0,001 % en peso a base, otra vez, de la concentración del anticuerpo. De manera frecuente, será conveniente incluir un diluyente o excipiente inerte para diluir los principios activos, donde el excipiente puede estar presente en de aproximadamente el 1 % al 99 % en peso de la composición total. Cuando se emplea en el ensayo un segundo anticuerpo que tenga la capacidad de unirse al anticuerpo primario, este habitualmente estará presente en un vial distinto. El segundo anticuerpo normalmente está conjugado a un marcador y está formulado de una manera análoga que las formulaciones de anticuerpo descritas anteriormente. En general, kit incluirá también un conjunto de instrucciones para su uso.

En una realización, un kit de acuerdo con la presente invención es un kit de tira reactiva (kit de inmunoensayo de flujo lateral) útil para la detección de la proteína IL-31 canina en una muestra. Tal tira reactiva normalmente incluye una capa de muestra sobre la que se aplica la muestra de ensayo; una capa de conjugado o de reactivo que

contiene un anticuerpo específico para la IL-31 canina, en la que el anticuerpo está conjugado a partículas coloreadas (habitualmente partículas de oro coloidal); una membrana de reacción sobre la que están inmovilizados anticuerpos anti IL-31 en una línea a través de la membrana, como una zona de captura o línea de ensayo (también puede estar presente una zona de control, que contiene anticuerpos específicos para los anticuerpos conjugados) y una capa absorbente adicional diseñada para extraer la muestra a través de la membrana de reacción mediante capilaridad, y recogerla. En general, el kit de tira reactiva incluirá también instrucciones de uso.

La invención se describirá ahora con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1 Identificación de anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen la Interleucina 31(IL-31) canina

La IL-31 canina recombinante se creó en células CHO utilizando el sistema CHROMOS ACE (Expresión de Cromosoma Artificial) (Chromos Molecular Systems, Inc., Burnaby, Columbia Británica) para generar la proteína IL-31 canina secretada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 32. Esta proteína está codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33. Se obtuvo el medio condicionado de 400 ml de cultivo celular (línea celular CHO) y se dializó frente a 10 volúmenes de tampón QA (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 20 mM) durante 4,5 horas. El medio dializado se filtró por 0,2 μ m y se cargó a 1 ml/min en una columna SOURCE™ Q (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) preequilibrada con tampón QA. La proteína se eluyó utilizando un gradiente lineal de etapas múltiples. La mayoría de la IL-31 permaneció en la fracción de flujo continuo (FC), una pequeña cantidad de IL-31 eluyó de forma temprana del gradiente. Previamente se confirmó la identidad de la proteína mediante inmunotransferencia de Western y análisis de espectrometría de masas (MS) de una digestión con tripsina. La proteína de la fracción FC se concentró 4-5 veces y se dializó una noche frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C. Se comprobó la estabilidad de la proteína después de la diálisis en PBS. No se observó precipitación y no se observó proteólisis tras varios días a 4 °C. Los experimentos de desglucosilación utilizando N-glucosidasa F dieron como resultado la condensación de la proteína en una única banda de -15 kDa en SDS-PAGE. La concentración de la proteína se determinó utilizando un ensayo bicinonínico (ensayo BCA) con seroalbúmina bovina (BSA) como patrón (ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL). La solución de proteína se dividió en alícuotas, se congeló de forma instantánea (N_2 líquido) y se almacenó a -80 °C.

Los anticuerpos monoclonales de ratón se identificaron utilizando inmunizaciones convencionales de ratones CF-1 hembra con IL-31 canina recombinante producida en células CHO. Los títulos de los ratones inmunizados se determinaron utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La IL-31 canina (50 ng/pocillo) se inmovilizó en microplacas de poliestireno y se utilizó como un antígeno de captura. El suero de los ratones inmunizados se diluyó en solución salina tamponada con fosfato con Tween-20 al 0,05 % (PBST). La presencia de anticuerpos anti-IL-31 canina de ratón se detectó con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Kirkegard & Perry Laboratories, Inc. (KPL, Inc.), Gaithersburg, MD). Después de la adición de un sustrato cromogénico (SureBlue Reserve TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, KPL, Inc., Gaithersburg, MD) y de una incubación de diez minutos a temperatura ambiente (TA), la reacción se detuvo con la adición de 100 μ l de HCl 0,1 N. Se determinó la absorbancia de cada pocillo a una densidad óptica (DO) de 450 nm. La Figura 6 resume la respuesta de anticuerpos de ratones individuales inmunizados con IL-31 canina. Para la fusión se utilizó un conjunto de esplenocitos de donante, de los ratones 3 y 4. Después de la fusión y de la exploración de la unión anti IL-31 a través de ELISA directo, se escogieron 100 pocillos para la expansión y la exploración secundaria de actividad anti IL-31. La exploración secundaria confirmó que 81 fusiones retuvieron la capacidad de producir anticuerpos anti IL-31. Para la evaluación adicional se conservaron reservas congeladas de células y de sobrenadantes de estos 81 candidatos.

Para identificar los candidatos con actividad inhibidora, se evaluó en un ensayo basado en células la capacidad de los 81 sobrenadantes para afectar la señalización de pSTAT mediada por IL-31. Este ensayo basado en células mide la señalización de pSTAT en monocitos DH-82 caninos pretratados durante 24 horas con interferón gamma canino (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 10 ng/ml y privados de suero durante 2 horas antes del tratamiento con IL-31, para aumentar la expresión del receptor de IL-31. Después de este pretratamiento, se añade IL-31 canina recombinante a 1 μ g/ml durante 5 minutos y se evalúa la fosforilación de STAT utilizando la tecnología Alpha Screen (Perkin Elmer, Waltham, MA). Dado que las concentraciones y la pureza de los anticuerpos son desconocidas en los sobrenadantes de hibridoma, se midió de forma cualitativa la capacidad de los sobrenadante de inhibir la fosforilación de STAT después de una coincubación de 1 hora con IL-31 1 μ g/ml, utilizando diluciones 1:2 o 1:20 de los sobrenadantes. Este experimento identificó 31 sobrenadantes que inhibían >50 % de la fosforilación de STAT con respecto a los pocillos no tratados, justificando de esta forma la purificación y caracterización adicional.

Después de la purificación y la cuantificación de cada anticuerpo monoclonal (Acm), se evaluaron en el ensayo de células DH-82 los valores de la CI_{50} de los 31 anticuerpos. A base de los valores de CI_{50} resultantes y de los ELISA competitivos para definir las clases de anticuerpo a base de agrupamientos de epítomos, se avanzó en la caracterización adicional de los tres anticuerpos descritos en la Tabla 1, 11 E12, 19D07 y 34D03.

TABLA 1

Anticuerpo	isotipo de HC	isotipo de LC
11E12	G1/2b	kappa
19D07	2b	kappa
34D03	G1	kappa

Ejemplo 2 Secuencias de ADN que codifican los anticuerpos 11E12, 19D07 y 34D03

- 5 Se aisló ácido ribonucleico (ARN) de células de los hibridomas 11 E12, 19D07 y 34D03 utilizando el kit Rneasy-mini (Qiagen, Inc., Germantown, MD) como describe el fabricante. Se recogieron por centrifugación un millón de células congeladas de cada hibridoma y se purificó el ARN de los lisados celulares utilizando la columna de centrifugación Rneasy de acuerdo con el procedimiento descrito en el protocolo. El ARN se eluyó de cada columna y se utilizó de forma inmediata para la cuantificación y preparación de ADNc. Se analizó el rendimiento y la pureza del ARN midiendo su absorbancia a 260 nm y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro GeneQuant pro (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Después del aislamiento, el ARN restante se almacenó a -80 °C para su uso posterior.
- 10 Se utilizaron cebadores oligonucleotídicos diseñados para la amplificación de los dominios variables de la inmunoglobulina (Ig) de ratón, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ). Se preparó ADNc a partir de ARN total de los hibridomas por transcripción inversa (TA), utilizando el kit thermoscript TA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 200-400 ng de ARN de cada hibridoma a un tubo de reacción individual que contenía un cebador para la región constante de Ig 3'. El cebador para Ig constante 3' se posiciona cerca de la región de Ig variable y transcribirá la primera cadena de ADNc, que representa la región variable del anticuerpo de ratón. Para el ARN de cada hibridoma se realizó una reacción de RT individual utilizando un cebador para la cadena pesada constante 3' y uno para la cadena ligera kappa constante 3'.
- 15
- 20 Se utilizó como molde ADNc de cada hibridoma en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADNc de las cadenas pesada y ligera kappa de IgG variables con el fin de determinar la secuencia. Se realizaron múltiples reacciones para cada PCR utilizando un cebador 5' degenerado o conjuntos de cebadores diseñados para aparearse con las regiones que codifican la secuencia señal del dominio variable de Ig de ratón. Se realizaron reacciones de PCR separadas con un cebador degenerado o conjuntos de cebadores, para la amplificación de las regiones de la cadena pesada variable y ligera variable de murino (Figura 7). La PCR se realizó con 1 µl de la reacción de ADNc utilizando el kit Expand High Fidelity DNA polymerase (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Los parámetros de termociclado para la PCR fueron los siguientes: 94 °C durante 2 min, 35 ciclos (94 °C 15 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 min), 72 °C 7 min. Los fragmentos amplificados de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel, en un gel de agarosa al 1 %, y se purificaron utilizando el kit de extracción en gel de Qiagen (Qiagen, Inc., Germantown, MD). Los cebadores directos para la región variable de cadena pesada y ligera incorporan sitios de EcoRI or Sall (New England Biolabs (NEB), Inc., Ipswich, MA) y los inversos para las cadenas variables pesada y ligera, HindIII (NEB Inc., Ipswich, MA), para facilitar la clonación en el plásmido pUC19. Los fragmentos de PCR purificados y el plásmido pUC19 se digirieron con las endonucleasas de restricción anteriores a 37 °C durante 1-2 horas. Después de la digestión, los fragmentos de PCR se purificaron utilizando el kit Qiaquick PCR cleanup (Qiagen, Inc., Germantown, MD). El plásmido digerido se separó mediante electroforesis en gel, en un gel de agarosa al 1 %, y se purificó utilizando el kit de extracción en gel de Qiagen. Los fragmentos de PCR purificados que representaban el ADN de la cadena pesa y ligera kappa de IgG variables se ligaron en el plásmido pUC19 utilizando T4 ADN ligasa y tampón de ligamiento (NEB, Inc., Ipswich, MA) a 4 °C durante una noche. Se utilizaron 3 µl de cada reacción de ligamiento para transformar células *E. coli* TOP10 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).
- 25
- 30
- 35
- 40 Se aislaron plásmidos de clones positivos que representaban las regiones variables de cada hibridoma utilizando el kit Qiagen mini prep (Qiagen 27106) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizaron los cebadores directo e inversos de M13 para amplificar la secuencia de ADN de cada inserto clonado utilizando la reacción de secuenciación de BigDye (Applied Biosystems by Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron utilizando un kit de purificación de 96 pocillos (Zymo Research, Irvine, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cargaron las muestras en un secuenciador capilar ABI-3730 y las señales de secuencia resultantes se analizaron utilizando Sequencher (GeneCodes v. 4.2) para la presencia de fases de lectura abierta completas. Las secuencias variables del anti IL-31 canina murino determinadas para cada anticuerpo son las siguientes, cadena ligera variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 19 MU-11 E12-VL, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 34), cadena pesada variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 26 MU-11 E12-VH, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 35), cadena ligera variable de 19D07 (SEQ ID NO: 22 MU-19D07-VL, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 36), cadena pesada variable de 19D07 (SEQ ID NO: 28 MU-19D07-VH, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 37), cadena ligera variable de 34D03 (SEQ ID NO: 24 MU-34D03-VL, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 38) y cadena pesada variable de 34D03 (SEQ ID NO: 30 MU-34D03-VH, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 39).
- 45
- 50
- 55

Para confirmar la validez de la secuencia de ADNc obtenida de cada una de las cadenas pesada y ligera variables de los anticuerpos, se llevó a cabo un análisis de secuencia N-terminal sobre la proteína del Acm purificado, utilizando degradación de Edman en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa modelo 494 de Applied Biosystems. La Tabla 2 describe a continuación la confirmación de las secuencias de la cadena ligera variable para los anticuerpos 11 E12 y 34D03 y la secuencia de la pesada variable de 34D03. El aminoácido N-terminal de la cadena pesada variable del anticuerpo 11 E12, obtenido mediante la traducción de la secuencia de ADNc, se determinó como glutamina. La glutamina, como resto amino terminal de una proteína, puede experimentar ciclizaciones a ácido piroglutámico de forma espontánea, impidiendo la determinación de secuencia mediante degradación de Edman (Chelius y col., Anal Chem. 2006 78(7):2370-6).

TABLA 2*

Cadena ligera variable		
Anticuerpo	Secuencia de ADNc traducida	Secuencia N-terminal
11E12	DIVLT	DIVLT
19D07	DIVMS	no ensayado
34D03	DILLT	DILLT
Cadena pesada variable		
Anticuerpo	Secuencia de ADNc traducida	Secuencia N-terminal
11E12	QVQLQ	bloqueada
19D07	EVKLV	no ensayado
34D03	EVQLV	EVQLV

* En la Tabla 2, "DIVLT" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 19, "DIVMS" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 22, "DILLT" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 24, "QVQLQ" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 26, "EVKLV" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 28 y "EVQLV" corresponde a los restos 1-5 de SEQ ID NO: 30.

Ejemplo 3 Construcción de los anticuerpos quiméricos de 11E12, 19D07 y 34D03

Como se describe anteriormente, los anticuerpos constan de un emparejamiento homodimérico de dos proteínas heterodiméricas. Cada cadena de proteína (una pesada y una ligera) del heterodímero consta de un dominio variable y un dominio constante. Cada dominio variable contiene tres regiones determinantes de complementariedad (las CDR) que contribuyen a la unión al antígeno. Las CDR están separadas en el dominio variable por regiones marco conservadas que proporcionan un armazón para la presentación espacial apropiada de los sitios de unión en el anticuerpo. Juntas, las regiones CDR y las marco conservadas, contribuyen a la capacidad de los anticuerpos de unirse a su antígeno afín (Figura 2).

Como se describe adicionalmente más arriba, un anticuerpo quimérico consiste en la secuencia variable (tanto la CDR como la región marco conservada) del anticuerpo de ratón (como se determina a partir del análisis de secuencia anterior) injertadas en las respectivas regiones constantes pesada y ligera de una molécula de IgG canina (Figura 3). Dado que el dominio variable es responsable de la unión al antígeno, se espera que el injerto del dominio variable de ratón completo en la región constante canina tenga poco o ningún impacto sobre la capacidad del anticuerpo de unirse al inmunógeno IL-31.

Para confirmar de forma simultánea que la secuencia correcta de las regiones variables de la cadena pesada y la ligera se habían identificado y para producir material recombinante homogéneo, se generaron vectores de expresión para producir anticuerpos quiméricos en sistemas de expresión de mamífero. Se diseñaron cebadores directos e inversos para amplificar la región variable de la cadena pesada y la ligera de ratón de la secuencia de anticuerpo obtenida de los hibridomas 11 E12, 19D07 y 34D03. Se incorporó en cada cebador directo un sitio de endonucleasa de restricción exclusivo, la secuencia consenso de Kozak y la secuencia líder de secreción, para facilitar la expresión y la secreción del anticuerpo recombinante en una línea celular de mamífero. Cada cebador inverso se diseñó para amplificar cada respectiva cadena pesada y ligera variable, e incluyó un sitio de restricción exclusivo para facilitar la clonación. Se realizó PCR para amplificar cada cadena pesada y ligera utilizando como molde para cada reacción el ADN clonado de la cadena variable del anticuerpo del hibridoma. Cada producto de PCR se clonó en un plásmido de expresión en mamífero que contenía las regiones constantes de la cadena pesada (denominada en el presente documento como HC-64 o HC-65) o de la ligera (denominada en el presente documento como kappa) de IgG canina, a base de las secuencias del GenBank números de referencia AF354264 o AF354265 y XP_532962, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de HC-64 están representadas por las SEQ ID NO: 40 y 41, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de HC-65 están representadas por las SEQ ID NO: 42 y 43, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de kappa están representadas por la SEQ ID NO: 44 y 45, respectivamente. Los plásmidos que codifican cada cadena pesada y ligera bajo el control del promotor de CMV, se cotransfectaron en células HEK 293 utilizando procedimientos por

lipofectamina convencionales. Después de seis días de expresión, los Acm quiméricos se purificaron de 30 ml de sobrenadante de células HEK293FS transfectadas de forma transitoria, utilizando la resina de proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), de acuerdo con procedimientos convencionales para la purificación de proteínas. Las fracciones eluidas se agruparon, se concentraron hasta ~500 μ l utilizando un dispositivo de centrifugación Nanosep Omega con límite de PM nominal de 10.000 (Pall Corp., Port Washington, NY), se dializaron durante una noche a 4 °C en PBS 1x, pH 7,2 y se almacenaron a 4 °C para el uso posterior.

La expresión de la IgG canina quimérica se evaluó utilizando electroforesis en poliacrilamida SDS (SDS PAGE) en condiciones nativas y desnaturalizantes. Los anticuerpos monoclonales (Acm) de cada transfección se separaron en un gel Bis Tris al 4-12 % utilizando tampón de procesamiento SDS MES de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Después de la electroforesis, las proteínas se visualizaron con tinción de azul de Coomassie Simply (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) para asegurar que se había producido un emparejamiento apropiado y proporcionar una evaluación cruda de la homogeneidad proteica. Para evaluar si los Acm recombinantes conservaban la capacidad de unirse a la IL-31 canina, se evaluó la capacidad de los Acm para unirse a IL-31 canina a través de transferencias de Western. Se resolvieron patrones de proteína y la IL-31 canina recombinante (800 ng) en SDS PAGE transferido a una membrana de nitrocelulosa utilizando el dispositivo Invitrogen iBlot (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Después de la transferencia, las membranas se lavaron con agua destilada desionizada y se bloquearon con leche en polvo desnatada (LPD) al 5 % en solución salina tamponada con fosfato que contenía tween-20 al 0,05 % (PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después del bloqueo, las membranas se lavaron en PBST y se incubaron con sobrenadante diluido de la expresión transitoria o anticuerpos quiméricos purificados. La unión de los anticuerpos quiméricos se evaluó utilizando anticuerpo de cabra anti-IgG de perro conjugado con peroxidasa (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX o Rockland, Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) a una dilución de 1:5.000 en PBST durante 1 hora a TA. La confirmación de la unión a IL-31 se determinó por la presencia de una banda colorimétrica (peso molecular aparente 15 kDa) que corresponde a la forma glucosilada de IL-31 canina después de la adición de sustrato TMB a la transferencia (KPL, Inc., Gaithersburg, MD).

Los Acm quiméricos que mostraron expresión a partir de las células HEK 293 y unión al inmunógeno IL-31 canina recombinante, se analizaron adicionalmente mediante transferencia de Western para la afinidad y funcionalidad. Para caracterizar la afinidad con la que los Acm candidatos se unían a IL-31, se evaluó por resonancia de plasmón superficial (RPS), utilizando un sistema Biacore (Biacore Life Sciences (GE Healthcare), Uppsala, Suecia). Para evitar las diferencias de afinidad asociadas con la preparación de superficie diferencial que puede producirse cuando se inmovilizan anticuerpos a superficies, se empleó una estrategia donde la IL-31 se conjugó de forma directa a la superficie. La inmovilización se obtuvo mediante acoplamiento de aminos de IL-31 5 μ g/ml utilizando química de N-hidroxisuccinimida (NHS)/1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Las microplacas se desactivaron con etanolamina y se evaluó la afinidad con la que todos los Acm candidatos se unieron a IL-31 inmovilizada. Todas las curvas se ajustaron a un modelo de 1:1. Las afinidades <E-11 están por debajo del límite inferior de cuantificación de detección del instrumento.

También se evaluó la capacidad de todos los Acm candidatos para inhibir la señalización de IL-31 en el ensayo basado en células en dos formatos independientes. En el formato de coincubación, los complejos Acm:IL-31 se preincubaron durante una hora para asegurar la formación del complejos antes de la adición de células. Para aumentar el potencial de diferenciación entre los Acm, se realizó un segundo conjunto de experimentos que carecía de coincubación y los Acm se añadieron de forma directa a las células durante 5 minutos después de la adición de IL-31. En ambos casos, la estimulación de IL-31 se produjo durante 5 minutos. Como se muestra en la tabla 3 a continuación, la conversión de los monoclonales de ratón 11E12, 19D07 y 34D03 a una forma quimérica canina, tuvo poco impacto en cuanto a su capacidad para unirse a IL-31 o inhibir la señalización mediada por células. Los resultados también verifican las secuencias correctas de las cadenas pesada variable y ligera variable obtenidas de cada hibridoma de ratón.

TABLA 3

Anticuerpo	Ensayo de pSTAT de DH82		Afinidad por Biacore
	Co-incubación Cl ₅₀ mg/ml	Pre-tratamiento Cl ₅₀ mg/ml	K _D (M)
11E12 de ratón	1,61	2,28	8,93E-13
▪ 11E12 quimérico	1,48	1,57	2,68E-13
19D07 de ratón	1,76	3,46	7,24E-12
* 19D07 quimérico	1,92	1,33	5,15E-13
34D03 de ratón	1,73	2,28	1,01E-12
▪ 34D03 quimérico	1,28	1,08	4,65E-12

▪ 11E12 quimérico para la cadena pesada, MU-11E12-VH se emparejó con HC-64 y para la cadena ligera MU-11E12-VL se emparejó con kappa.

(continuación)

Anticuerpo	Ensayo de pSTAT de DH82		Afinidad por Biacore
	Co-incubación CI ₅₀ mg/ml	Pre-tratamiento CI ₅₀ mg/ml	K _D (M)

*19D07 quimérico para la cadena pesada, MU-19D07-VH se emparejó con HC-64, y para la cadena ligera, MU-19D07-VL se emparejó con kappa.

▪ 34D03 quimérico para la cadena pesada, MU-34D03-VH se emparejó con HC-64, y para la cadena ligera, MU-34D03-VL se emparejó con kappa.

Ejemplo 4 Evaluación *in vivo* de los Acm quiméricos

Para confirmar que la inhibición de la señalización celular mediada por IL-31, observada en el ensayo de DH-82, se correlaciona con la inhibición del prurito mediada por IL-31 en el perro, el anticuerpo monoclonal 11 E12 quimérico descrito anteriormente en la Tabla 3 (11 E12-64 quimérico) se evaluó en el modelo de prurito de perro de IL-31. En este modelo, la IL-31 canina, proporciona por vía intravenosa (IV) a una dosis de 1 a 1,5 µg/kg, produce un rápido inicio de respuesta prurítica consistente que puede cuantificarse a lo largo de un período de dos horas de observación. Para evaluar las respuestas pruríticas, se colocaron los perros en jaulas de alojamiento individuales y las mediciones de actividad pruriginosa se realizaron utilizando video vigilancia. Después de un período de aclimatación de ≥ 1 hora, se determinaron las puntuaciones de prurito de la medida inicial para cada perro utilizando video vigilancia en tiempo real utilizando un sistema de puntuación categórico. En concreto, se tomaron decisiones de tipo "sí/no" a intervalos consecutivos de 1 minuto con respecto a si cada perro presentaba comportamiento prurítico. La presentación de comportamiento prurítico tales como acciones de lamido/mordisqueo de las patas, costados y/o región anal, rascado de los costados, cuello y/o del piso, agitación de la cabeza y deslizamiento de un lado a otro de su trasero sobre el piso de la jaula, fue suficiente para generar una respuesta afirmativa, "sí", durante el intervalo de tiempo designado. Al final de este período, se añadió la cantidad de determinaciones afirmativas, para llegar a un Índice de Puntuación de Prurito (IPP) acumulativo. Las puntuaciones de prurito se determinaron dos veces para cada animal, siendo la primera medición a los 30 minutos de la puntuación de medida inicial medida inmediatamente antes del inicio del período de tratamiento del artículo de ensayo. Tras la finalización de cada período de observación programado, los perros regresaron a sus emplazamientos de alojamiento normales.

Para evaluar si la administración subcutánea (SC) de E12-64 quimérico podía inhibir el prurito mediado por IL-31, se realizó un estudio piloto (76A03) que incluyó tanto un grupo tratado como uno de placebo (N = 4/grupo). En este estudio, las respuestas de medida inicial se realizaron con los 8 perros y dichos perros se asignaron al azar en grupos y se alojaron en función de su IPP. Cabe destacar que, cada grupo consistió en dos respondedores altos (IPP >55) y en dos respondedores moderados (IPP = 30 a 55). Después, a los perros se les administró 11 E12-64 quimérico el día 7 y se realizaron exposiciones a IL-31 los días 8, 14 y 22. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 8. Estos resultados demuestran que la administración de 11 E12-64 quimérico producía una reducción mayor del 75 % del IPP promedio para los días 8 y 14, con respecto al día 1, para los animales tratados con 11 E12-64 quimérico. Esto contrasta con un aumento de 37 - 51 % de las puntuaciones IPP para los animales no tratados. El IPP volvió a la medida inicial dos semanas después del tratamiento con Acm, lo que sugiere una duración de la eficacia de entre una y dos semanas para la dosis administrada de 0,3 mg/kg.

Un reto particular cuando se evalúa el IPP, es la variación diaria asociada con el comportamiento prurítico en el perro. Para ayudar a controlar esta variación, se determinó un IPP de medida inicial de 30 minutos para cada perro, el día anterior a la exposición a IL-31. La Figura 9 muestra las puntuaciones de prurito individuales entre los perros incluidos en este estudio (76A60). Los datos de la Figura 9 ilustran que el IPP de medida inicial del día 8 y del día 14 fue de aproximadamente el 25 % de la exposición posterior con IL-31 en el grupo tratado con 11 E12-64 quimérico. Esta observación es coherente con una anulación completa del prurito relacionado con IL-31, dado que el período de tiempo de observación de medida inicial (0,5 h) es del 25 % del período de tiempo de observación post IL-31 (2 h). En conjunto, estos datos *in vivo* proporcionan pruebas contundentes de que; 1) el monoclonal 11 E12 quimérico puede neutralizar la capacidad de IL-31 para inducir prurito en perros, 2) la inhibición de la señalización mediada por IL-31 en el ensayo basado en células se correlaciona con la eficacia *in vivo* y 3) los parámetros necesarios para utilizar este modelo de IL-31 para la evaluación de Acm se establecen para la evaluación de otros anticuerpos candidatos.

Ejemplo 5 Estrategia de Caninización

La generación de anticuerpos antifármaco (AAF) puede asociarse con la pérdida de eficacia de cualquier proteína bioterapéutica, incluyendo los anticuerpos monoclonales. Una evaluación exhaustiva de la biografía ha mostrado que la especiación de los anticuerpos monoclonales puede reducir la propensión de los Acm para ser inmunogénicos, aunque se pueden encontrar ejemplos de Acm inmunogénicos completamente humanos y Acm quiméricos no inmunogénicos. Para ayudar a mitigar los riesgos asociados con la formación de AAF para los anticuerpos monoclonales IL-31 de ratón proporcionados en el presente documento, se empleó una estrategia de caninización. Esta estrategia de caninización se basa en la identificación de las secuencias de anticuerpo de estirpe

germinal de canino más apropiadas para el injertado de CDR (Figura 4). Después de un amplio análisis de todas las secuencias de estirpe germinal de canino disponibles tanto para la cadena pesada como para la ligera, los candidatos de estirpe germinal se seleccionaron en función de su homología con los Acm de ratón y las CDR de los Acm progenitores de ratón se utilizaron para reemplazar las CDR de canino nativas. El objetivo fue conservar una alta afinidad y actividad basada en células utilizando regiones marco conservadas completamente de canino para minimizar el potencial de inmunogenicidad *in vivo*. Se expresaron los Acm caninizados y se caracterizó su capacidad para unirse a IL-31 a través de transferencia de Western. Estos resultados se describen a continuación en el Ejemplo 8. Solo los Acm que conservaron la capacidad de unirse a IL-31 después de la caninización se desarrollaron para una caracterización adicional. Los Acm que perdieron la capacidad de unirse a IL-31 se analizaron minuciosamente de forma sistemática para identificar; 1) la cadena responsable de la pérdida de función, 2) la región marco conservada responsable de la pérdida de función y 3) el aminoácido (o aminoácidos) responsable de la pérdida de función.

Ejemplo 6 Caninización de los anticuerpos 11E12, 19D07 y 34D03

Se fabricaron construcciones de nucleótidos sintéticas que representaban las cadenas pesada y ligera variables caninizadas de los Acm 11 E12, 19D07 y 34D03. Después de la subclonación de cada cadena variable en plásmidos que contenían las respectivas regiones constantes pesada y kappa de canino, los plásmidos se cotransfectaron para la expresión de anticuerpos en células HEK 293. En resumen, los Acm 19D07 y 34D03 conservaron la unión a IL-31 tras la caninización. Las secuencias variables de anti IL-31 de canino caninizadas, determinadas para cada anticuerpo son las siguientes, cadena ligera variable de 19D07 (SEQ ID NO: 23 CAN-19D07-VL-998-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 46), cadena pesada variable 19D07 (SEQ ID NO: 29 CAN-19D07-VH-400-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 47), cadena ligera variable 34D03 (SEQ ID NO: 25 CAN-34D03- VL-998-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 48) y cadena pesada variable de 34D03 (SEQ ID NO: 31 CAN-34D03-VH-568-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 49).

Por el contrario, las secuencias de estirpe germinal utilizadas para los esfuerzos de caninización de 11 E12 dieron como resultado determinados Acm no funcionales. Con referencia a la Figura 10, las versiones quimérica, heteroquimérica y caninizada del Acm 11E12, se expresaron y se caracterizó su capacidad de unirse a IL-31 a través de transferencia de Western. Estos resultados demostraron que el anticuerpo 11 E12 caninizado no se une a IL-31 de canino (Transferencia n.º 2). Además, con respecto a las heteroquimeras, la cadena pesada quimérica emparejada con la ligera caninizada perdió la unión a IL-31 (Transferencia n.º 3), mientras que la cadena pesada caninizada emparejada con la ligera quimérica conservó la actividad de unión a IL-31 (Transferencia n.º 4). Basándose en estos resultados obtenidos de las heteroquimeras, se dedujo que la cadena ligera caninizada era responsable de la pérdida de actividad.

En un esfuerzo para restablecer la unión de las versiones caninizadas de E12 con la IL-31 de canino, la cadena ligera caninizada se modificó mediante intercambio de secuencias marco conservadas. La Figura 11 proporciona una visión de conjunto del trabajo de sustitución de la región marco conservada de la cadena ligera de 11 E12. Este trabajo identificó un anticuerpo que reemplazaba la región marco conservada II (FWII, *Framework II*) de canino por la región marco conservada II de ratón y que restablecía la unión con la IL-31 de canino (cadena ligera variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 20 CAN-11 E12-VL-cUn-FW2) cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 50), cadena pesada variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 27 CAN-11 E12-VH-415-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 51)).

Un perfeccionamiento adicional de estas retromutaciones identificó un anticuerpo con una sola retromutación de arginina a leucina (R50L) en la región marco conservada II que pudo restablecer la unión a IL-31 a través de análisis de transferencia de Western (cadena ligera variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 21 CAN-11 E12-VL-cUn-13, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 52), cadena pesada variable de 11 E12 (SEQ ID NO: 27 CAN-11E12-VH-415-1)) (Figura 12). Una vez identificadas las versiones 'caninizadas' de cada posible candidato, los Acm se purificaron y dializaron en PBS para una evaluación adicional. La Tabla 4 resume los resultados de las mediciones de afinidad y de los datos de inhibición basados en células. Estos datos demuestran que los derivados caninizados tanto de 11 E12 como de 34D3 conservaban una excelente actividad inhibidora en el ensayo basado en células y en la afinidad por IL-31, medido por Biacore. También merece la pena destacar que aunque la molécula de 19D7 caninizada original conserva una potencia excelente, medida por Biacore, la capacidad de inhibir la señalización de IL-31 basada en células parece comprometida con respecto a su progenitor de ratón. Se provocó poca o ninguna pérdida de afinidad cuando se convirtieron los Acm de su isotipo de ratón al derivado de canino.

TABLA 4

Anticuerpo	Ensayo de pSTAT de DH82		Afinidad por Biacore
	Co-incubación CI_{50} μ g/ml	Pre-tratamiento CI_{50} μ g/ml	K_D (M)
11E12 de Ratón	1,61	2,28	8,93E-13
11E12 Caninizado	no activo	no activo	5,06E-07
Heteroquimera de 11E12	2,67	3,35	4,97E-12
11E12 FW2 Caninizado	2,7	5,31	1,47E-10
11E12 13 Caninizado	5,49	5,18	5,16E-12
19D07 de Ratón	1,76	3,46	7,24E-12
19D07 Caninizado	curva inc.	curva inc.	9,23E-10
34D03 de Ratón	1,73	2,28	1,01E-12
34D03 Caninizado	2,42	2,25	2,91E-11

Anticuerpo	Cadena Variable	
	Pesada	Ligera
11E12 Caninizado	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-1
Heteroquimera de 11E12	CAN-11E12-VH-415-1	11E12 Quimérico
11E12 FW2 Caninizado	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-FW2
11E12 13 Caninizado	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-13
19D07 Caninizado	CAN-19D07-VH-400-1	CAN-19D07-VL-998-1
34D03 Caninizado	CAN-34D03-VH-568-1	CAN-34D03-VL-998-1

Cadenas pesadas: Todas las formas caninizadas y heteroquiméricas de 11 E12 incluyen la secuencia de V_H de CAN-11E12-VH-415-1 (SEQ ID NO: 27) y la región constante denominada HC-64 (SEQ ID NO: 40); 19D07 caninizado incluía la secuencia de V_H de CAN-19D07-VH-400-1 (SEQ ID NO: 29) y HC-64; 34D03 caninizado incluía la secuencia de V_H de CAN-34D03- V_H -568-1 (SEQ ID NO: 31) y HC-64.

Cadenas ligeras: 11E12 caninizado incluía la secuencia de V_L de CAN-11E12-VL-cUn-1 (SEQ ID NO: 53) y la región constante denominada kappa (SEQ ID NO: 44); 11E12 heteroquimérico incluía la secuencia de V_L de MU-11E12-VL (SEQ ID NO: 19) y kappa; 11E12 FW2 caninizado incluía la secuencia de V_L de CAN-11E12-VL-cUn-FW2 (SEQ ID NO: 20) y kappa; 11E12 caninizado incluye la secuencia de V_L de CAN-11E12-VL-cUn-13 (SEQ ID NO: 21) y kappa; 19D07 caninizado incluía la secuencia de V_L de CAN-19D07-VL-998-1 (SEQ ID NO: 23) y kappa; 34D03 caninizado incluía la secuencia de V_L de CAN-34D03-VL-998-1 (SEQ ID NO: 25) y kappa.

Ejemplo 7 Caracterización de la unión de IL-31 de canino con los anticuerpos 11E12 y 34D03

Para determinar los restos de aminoácido implicados en la unión a IL-31 de canino de los anticuerpos 11E12 y 34D03, se utilizó una estrategia mutacional que implicaba 1) el truncamiento de la proteína IL-31 tanto del extremo N como del C y 2) el reemplazo de aminoácidos individuales por alanina (mutagénesis mediante alanina) para determinar el impacto sobre la unión del Acm. Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar un gen de IL-31 de canino que se optimizó con codones para la expresión en un hospedador de *E. coli*. La secuencia de esta construcción de IL-31 de canino de longitud completa con codones optimizados para la expresión en *E. coli* se representa en la SEQ ID NO: 55, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 56. Se diseñaron cebadores para amplificar el gen de longitud completa y para crear truncamientos de 20 aminoácidos de la proteína desplazándose hacia el interior desde los extremos N y C. Con el fin de realizar estos truncamientos N-terminales, la posición 1 correspondía con el resto de glicina inmediatamente después de la etiqueta de 6-His N-terminal en la construcción con codones optimizados. Los productos de amplificación por PCR se clonaron en pET1 01 D (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El plásmido pET101D permite la fusión de la proteína recombinante con una etiqueta epitópica de 6-His N terminal para la confirmación de la expresión. Los plásmidos con secuencias confirmadas se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21 Star TOP10 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se indujo la expresión de la proteína recombinante utilizando Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM en condiciones de cultivo convencionales. Después de las inducciones, las células se sedimentaron y se lisaron utilizando Reactivos de Extracción de Proteínas Bacterianas (abreviado B-PER, ThermoFisher Scientific Inc., Rockford, IL). Los lisados crudos se sometieron a SDS-PAGE y a transferencia de Western y la transferencia de Western se llevó a cabo como se describió anteriormente. Todas las transferencias de Western para el análisis mutacional se realizaron utilizando las versiones de ratón de 11 E12 y 34D03 debido a la disponibilidad de los anticuerpos purificados y reactivos necesarios. Se analizó la capacidad de cada anticuerpo para unirse a la transferencia de lisado de proteína crudo, que representaba IL-31 de longitud completa y truncada. Las transferencias de control también se sondaron con el Acm anti-His para confirmar la expresión de cada proteína. Las proteínas con un truncamiento N-terminal (-20N, -40N y -60N) mostraron todas una expresión fuerte en *E. coli* y tenían la capacidad de unirse a 11 E12 y a 34D03 (Figura 13). Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que

corresponden a la construcción -20N son las SEQ ID NO: 57 y 58, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que corresponden a la construcción -40N son las SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que corresponden a la construcción -60N son las SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente. Sin embargo, la IL-31 de longitud completa y las proteínas con truncamientos C-terminales (-20C, -40C y -60C) no pudieron expresarse en estas condiciones.

Se observó que la proteína IL-31 de longitud completa se expresó muy mal. Sin embargo, la construcción con los 20 primeros aminoácidos eliminados (-20N) del extremo N mostró una expresión fuerte. Los anticuerpos 11 E12 y 34D03 se unieron a la proteína -20N. Por lo tanto, se llevó a cabo un trabajo adicional utilizando esta construcción -20N. Se fabricaron construcciones que representaban truncamientos C-terminales en las posiciones 20-122 (PM 15,3 con la etiqueta his), 20-100 (PM 12,9 con la etiqueta his) y 20-80 (PM 10,4 con la etiqueta his) para evaluar la unión del Acm con estas zonas en la proteína IL-31. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que corresponden a la construcción 20-122 son las SEQ ID NO: 63 y 64, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos que corresponden a la construcción 20-100 son las SEQ ID NO: 65 y 66, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que corresponden a la construcción 20-80 son las SEQ ID NO: 67 y 68, respectivamente. La Figura 14 muestra las transferencias de Western de lisados de proteína crudos de estas proteínas truncadas que se sondaron con los Acm 11E12 (Transferencia B) y 34D03 (Transferencia C). Como se muestra en esta Figura, los Acm 11E12 y 34D03 se unieron a las proteínas IL-31 truncadas 20-122 y 20-100, pero no pudieron unirse a 20-80. Estos resultados indicaron que los aminoácidos entre las posiciones 80 y 100 de la construcción de IL-31 de canino de longitud completa de SEQ ID NO: 55 (utilizando "SSHMA" como el extremo N) estaban implicados en la unión de estos anticuerpos. Esta región corresponde a los Números de aminoácido entre los restos de aminoácidos 102 y 122 de la secuencia de la proteína IL-31 de canino de longitud completa de SEQ ID NO: 32. Una transferencia de control utilizando el Acm anti-His (Transferencia A) mostró que todas las proteínas truncadas se habían expresado. Además, la proteína pET101D-lacZ se utilizó como un control para confirmar la falta de unión no específica de los Acm con proteínas hospedadoras.

Para identificar adicionalmente los aminoácidos en la IL-31 canina implicados con la unión a los anticuerpos 11 E12 y 34D03, se realizó mutagénesis por alanina de acuerdo con los procedimientos conocidos. Las construcciones individuales se fabricaron (en el plásmido -20N) sustituyendo por alaninas en cada posición de IL-31 canina desde el aminoácido 76 hasta el 122. Después de la confirmación de la secuencia, se llevó a cabo la expresión de la proteína y los lisados de proteína crudos se sometieron a análisis por transferencia de Western. La Figura 15 muestra un resumen de los resultados indicando las posiciones en la IL-31 canina que, cuando se mutan a alanina, impactan en la unión de los Acm 11 E12 y 34D03. Como se muestra en esta Figura, las posiciones 77, 78, 81 y 85 de la construcción de IL-31 de longitud completa impactan todas sobre la unión de los anticuerpos 11 E12 o 34D03. Estos corresponden con los restos de aminoácido 99, 100, 103 y 107, respectivamente, de la secuencia de proteína de IL-31 canina de longitud completa de SEQ ID NO: 32.

Para examinar el impacto de múltiples mutaciones en la región de IL-31, importante para la unión a los anticuerpos 11 E12 y 34D03, se construyeron plásmidos de expresión con dobles (D82A, I85A) y triples (I81A, D82A, I85A) sustituciones de alanina. Los lisados de *E. coli* que expresaban IL-31 canina con estas dobles y triples mutaciones, además del control -20N, se transfirieron con los anticuerpos 11 E12 y 34D03 (Figura 16). Es obvio que estos tres aminoácidos en IL-31 canina están implicados en el reconocimiento de 11 E12 y 34D03 dado que se observa una anulación completa de la unión cuando estos sitios se cambian a alanina. Estos tres aminoácidos corresponden a los restos de aminoácido 103, 104 y 107 de la secuencia de la proteína IL-31 canina de longitud completa de SEQ ID NO: 32.

En resumen, el análisis del truncamiento de IL-31 canina reveló restos de aminoácido (anotados en la Figura 15 entre las posiciones 80 y 122) que están implicados en la unión de los anticuerpos 11 E12 y 34D03. Adicionalmente, un análisis mutacional refinado utilizando mutagénesis mediante alanina reveló que ASP77, LYS78, ILE81, ASP82 e ILE85 de la construcción de IL-31 de longitud completa impactaban todos en la unión de 11 E12 o 34D03 indicando que esta región define muy probablemente el epítipo responsable del reconocimiento de estos anticuerpos. Cabe destacar que, esta región de la proteína IL-31 de ser humano mostró estar implicada en la unión a la subunidad GPL de su correceptor (Le Saux S y col. *Biol Chem.* 29 de enero de 2010; 285(5):3470-7. Epub 17 de noviembre de 2009). Estas observaciones, junto con la capacidad de los Acm 11 E12 y 34D03 de neutralizar la actividad de pSTAT mediada por IL-31 en monocitos, confirma la hipótesis de que estos Acm se unen a restos en IL-31 canina que son esenciales para la unión de esta citocina con su receptor, inhibiendo de este modo su capacidad para inducir la señalización.

Ejemplo 8 Producción de anticuerpos 34D03 caninizados a partir de plásmidos de glutamina sintasa (GS)

Los genes que codifican el Acm 34D03 caninizado (cadenas pesada y ligera, Tabla 4 anterior) se clonaron en los plásmidos de GS pEE 6.4 y pEE 12.4, respectivamente (Lonza, Basel, Suiza). Los plásmidos resultantes se digirieron de acuerdo con el protocolo del fabricante y se ligaron conjuntamente para formar un único plásmido de expresión de mamífero. Cada plásmido se utilizó para transfectar células HE 293 y se llevó a cabo la expresión en 20 l de medio de cultivo. La proteína se aisló del medio HEK acondicionado utilizando cromatografía de afinidad de proteína A de acuerdo con procedimientos convencionales de purificación de proteínas. El medio se cargó en la resina cromatográfica y se eluyó mediante un cambio de pH. Se ajustó el pH de la proteína eluída, se dializó y se

esterilizó por filtración antes de su uso. El anticuerpo resultante era más del 99 por ciento monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica, sin observarse agregados de alto peso molecular. Este anticuerpo se utilizó posteriormente para la evaluación en el modelo de prurito de perro para evaluar la eficacia *in vivo*.

Ejemplo 9 Evaluación del anticuerpo 34D03 caninizado en el modelo de prurito de perro

5 La actividad antipruriginosa de 34D03 caninizado (CAN 34D03-65 representado por SEQ ID NO 31 (VH) emparejada con SEQ ID NO 25 (VL) en SEQ ID NO 42 (HC-65) y SEQ ID NO 44 (LC-Kappa)) se evaluó utilizando un modelo canino de prurito inducido por IL-31. Con este modelo, se suministró de forma repetida una dosis intravenosa de 1,5 µg/kg de IL-31 canina recombinante que se sabe que induce un periodo transitorio de comportamiento prurítico en perros *Beagle* (exposición a IL-31, duración del prurito < 24 horas) antes y hasta 63 días después de una sola dosis SC de CAN 34D03-65 1,0 mg/kg. En cada periodo de exposición a IL-31, se utilizó video vigilancia en tiempo real para obtener una medida del comportamiento prurítico durante 0,5 horas antes del suministro de la citocina (periodo de medida inicial pre-IL-31) seguido de una medición similar de 2 horas que comenzó 20 minutos tras la inyección de citocina (periodo de exposición post-IL-31 de 2 h). Las puntuaciones de prurito se generaron en cada periodo de tiempo bajo evaluación haciendo determinaciones de tipo "si/no" si se presentaba un comportamiento prurítico durante intervalos de tiempo consecutivos de 1 minuto (puntuación de prurito máxima = 30 para cada periodo de medida inicial; 120 para el periodo de exposición post-IL-31). La Figura 17 resume las puntuaciones de prurito obtenidas antes y después de tratamiento con CAN 34 D03-65, que se proporcionó el día 0 del estudio. Siete días antes del tratamiento con Acm, la puntuación de prurito posterior a la exposición a IL-31 promedio de los perros fue de 68 ± 13 (E.T., n=4). Por comparación, los días de estudio 7, 14, 21, las puntuaciones de prurito promedio posteriores a la exposición con IL-31 se habían reducido a 5 ± 2 , 8 ± 4 , y 9 ± 5 , respectivamente. Estos cambios en la puntuación de prurito entre el día -7 y los días 7-21 representaron una disminución $\geq 85\%$ de la reactividad prurítica global para IL-31.

El grado de inhibición de prurito inducido por IL-31 puede, de hecho, haber estado más cerca del 100 % durante este periodo de tiempo si se considera que entre los días 0 y 21, las puntuaciones de medida inicial pre-IL-31 de 0,5 h promediaron $1,6 \pm 0,6$ - un nivel que se extrapolaría con una puntuación de prurito de 6-7 durante un periodo de 2 h. La reactividad prurítica de los perros tratados con IL-31 exógena se recuperó de forma gradual a lo largo del tiempo. El día 63 posterior al tratamiento con CAN D03-65, la puntuación de prurito posterior a la exposición a IL-31 de 2 h promedio había aumentado hasta 57 ± 8 o aproximadamente el 84 % de las respuestas preexposición al Acm de IL-31 observadas en el día -7. Por lo tanto, en un modelo de prurito inducido por IL-31, una sola inyección en embolada SC de CAN 34D03-65 proporciona semanas de protección antiprurítica a los perros tratados.

Ejemplo 10 Caracterización de IL-31 de felino

La secuencia de IL-31 de felino se identificó mediante una búsqueda de similitud del genoma de felino con IL-31 de canino utilizando los recursos de genoma del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). El gen que representa la IL-31 de felino se sintetizó para la expresión óptima en *E. coli*. Las construcciones de expresión se crearon con los genes de IL-31 de canino y felino de longitud completa que contenían una etiqueta de 6 His N-terminal para la detección y purificación. La construcción de felino de longitud completa utilizada para la expresión en *E. coli* está representada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 69 y la secuencia de proteína de SEQ ID NO: 70. Los plásmidos con secuencia confirmada se utilizaron para transformar *E. coli* BL21 Star™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se llevó a cabo la expresión a 30 °C durante 5 horas. Después de la lisis de los sedimentos celulares se encontró que la proteína inmunorreactiva estaba altamente enriquecida en el lisado insoluble. Estos sedimentos celulares se solubilizaron en urea 6 M y la purificación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes utilizando una resina de níquel cobalto (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Las fracciones eluidas agrupadas, que mostraron ser positivas a la presencia de la etiqueta de His, se dializaron por etapas frente a PBS urea 0,8 M seguido de PBS, y se analizaron mediante SDS PAGE (Figura 18). Como se observó anteriormente, el rendimiento de la IL-31 de canino recombinante a partir de la inducción en *E. coli* fue bajo. Sin embargo, se recuperó proteína después de la purificación que migró de acuerdo con la masa molecular esperada a través de SDS-PAGE.

Para examinar la actividad biológica de la IL-31 de canino y felino producida a partir de *E. coli*, se analizó la capacidad de cada proteína para inducir la señalización de pSTAT en el ensayo de células DH82. Dado que la IL-31 recombinante a partir de células de mamífero (IL-31(CHO) de canino) está altamente glucosilada, no estaba claro si la forma no glucosilada conservaría la actividad biológica. La Figura 19 muestra que la IL-31 de felino tiene bioactividad comparable con la IL-31 de referencia producida en células CHO.

La mutagénesis mediante alanina de la IL-31 de canino definió una región dentro de la proteína que es necesaria para la unión a los anticuerpos 11 E12 y 34D03. Se formuló la hipótesis de que, debido a la conservación de secuencia en esta región (Figura 20), estos Acm tendrían reactividad cruzada con la IL-31 de felino.

La Figura 21 muestra que los Acm 11E12 y 34D03 tienen la capacidad de unirse a la IL-31 de canino (*E. coli*) y que también tienen la capacidad de reaccionar de forma cruzada con la proteína IL-31 de felino. Basándose en estos datos, la especiación del anticuerpo 34D03 se aplicó a la de los felinos (felinización).

Ejemplo 11 Felinización del anticuerpo 34D03

De forma similar a la estrategia de caninización descrita, se identificaron secuencias de anticuerpos de estirpe germinal apropiadas a partir de todas las secuencias de felino disponibles para el injerto de CDR procedente del Acm 34D03. La cadena ligera variable (SEQ ID NO: 71 FEL-34D03-VL-021-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 72) y la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 73 FEL-34D03-VH-035-1, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 74) se seleccionaron en función de la homología más alta con sus respectivas regiones marco conservadas de canino en el anticuerpo 34D03 caninizado. El anticuerpo 34D03 felinizado recombinante se produjo utilizando las regiones variables seleccionadas unidas a su respectiva secuencia de la cadena de IgG1 pesada constante (SEQ ID NO: 75 HC-A de felino, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 76 del GenBank n.º de referencia AB016710.1) y ligera constante kappa (SEQ ID NO: 77 LC-Kappa de felino, cuya secuencia de nucleótidos correspondiente es SEQ ID NO: 78 del GenBank n.º de referencia AF198257.1). Se produjo el anticuerpo a partir de células HE y se purificó como se describe anteriormente. La Figura 22 muestra la capacidad del anticuerpo 34D03 de felino de neutralizar la señalización de pSTAT con una CI50 comparable a la de la versión canina.

Se evaluó la capacidad del anticuerpo 34D03 felinizado para unirse tanto a la IL-31 de felino como de canino. La Figura 23 muestra transferencias de Western con 34D03 felinizado utilizando proteína purificada de fuentes tantos de mamífero como de *E. coli*. Se observó una unión concluyente tanto a proteínas de canino como de felino, lo que indicó una reactividad cruzada completa de la forma felinizada de 34D03 y la verificación de la unión a la proteína de felino. Considerados en su conjunto, estos resultados sugieren que un epítipo conservado de IL-31 de felino puede ser una diana adecuada para la inhibición de esta citocina en gatos.

Ejemplo 12 Detección de la citocina IL-31 en perros con dermatitis atópica de origen natural

En el presente Ejemplo, se evaluó el nivel de la proteína IL-31 en suero recogido de poblaciones de perros, incluyendo aquellos con dermatitis atópica, utilizando una técnica de inmunoensayo cuantitativa.

Se recogió suero de las siguientes poblaciones de perros y se congeló antes de realizar las mediciones de IL-31 en el suero.

- 1) De veinticuatro perros Beagle (Marshall BioResources, North Rose, NY) criados para este fin antes y después de la sensibilización al alérgeno del ácaro del polvo (*Dermatophagoides farina*, Greer Labs). Todos los animales tenían aproximadamente 9 meses. Los dos sexos estaban representados aproximadamente por igual.
- 2) De treinta perros alérgicos a las pulgas (Youngs Veterinary Research Services, Turlock, CA) antes de la infestación con pulgas o aproximadamente una semana después de la infestación con pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*) adultas. En esta colonia, la mayoría de los perros eran mestizos. La edad promedio era de aproximadamente 10,5 años. Los dos sexos estaban representados aproximadamente por igual.
- 3) De ochenta y siete perros con dueño, cuyos perros tenían enfermedad periodontal subclínica pero que se determinó de otro modo que estaban en buen estado de salud. Las muestras se recogieron en 18 clínicas veterinarias de EE.UU. Los animales eran representativos de la población canina de los Estados Unidos, en cuanto a género y raza, y tenían entre dos y cinco años.
- 4) De doscientos y veinticuatro animales con dueño, a cuyos perros se les había diagnosticado dermatitis atópica crónica no estacional de al menos 1 año de duración (en función de los criterios de Willemse modificado y de Prelaud (Willemse T. J small Anim Pract 1986; 27:771-778 y Prelaud y col. Revue de Medecine Veterinaire 1998; 149: 1057-1064) con un mínimo de "picor moderado" evaluado por el dueño, y una puntuación de lesión cutánea mínima de 25 en el CADESI-02) evaluada por un veterinario. Se recogieron muestras procedentes de 14 prácticas veterinarias realizadas en los Estados Unidos, por expertos en dermatología veterinaria. Aproximadamente el 75 % de los perros eran de pura raza y aproximadamente el 25 % de la población total eran perros cobradores (Labrador (17,3 %) y Golden (8,2 %)). Los perros tendían a ser de mediana edad (~ 6 años). Los dos sexos estaban representados aproximadamente por igual.

Se utilizó un inmunoensayo de tipo sándwich para cuantificar los niveles de cIL-31 en el suero de caninos. Las muestras de suero se diluyeron a 1:2 en tampón Rextip (Gyrolab, Warren, NJ) y se procesaron en CDs de Bioaffy 1000 nl (Gyrolab) utilizando la estación de trabajo Gyrolab xP. La cIL-31 se capturó con un anticuerpo monoclonal anti-IL-31 marcado con biotina de acuerdo con la presente invención y se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-IL-31 marcado con Alexafluor 647 de acuerdo con la presente invención. Las concentraciones de cIL-31 de las muestras se extrapolaron a partir de una curva patrón de 8 puntos con un intervalo dinámico de 0,013-250 ng/ml utilizando un modelo de ajuste de 5 parámetros con el programa informático Gyrolab Evaluator.

Los niveles de cIL-31 eran detectables en las muestras de suero del 75 % de los perros con dermatitis atópica de origen natural (≥ 13 pg/ml) pero no fueron detectables (< 13 pg/ml) en el suero de los perros Beagle criados para este fin +/- sensibilizados a AP, de perros mestizos +/- infestación con pulgas o de perros con dueño con enfermedad periodontal, pero considerados de otra forma en buen estado de salud, independientemente de la raza. En los perros con dermatitis atópica de origen natural, el 53 % de las muestras analizadas mostró niveles de IL-31 en suero de entre 13-1000 pg/ml, y el 4 % mostró niveles por encima de 1000 pg/ml (Tabla 5).

Tabla 5: Niveles de IL-31 en suero en diversas poblaciones de caninos

Poblaciones de caninos	Número de animales evaluados	Número de animales con IL-31 en suero detectable ^a	Porcentaje de animales con IL-31 en suero detectable
Beagles criados para este fin	24	0	0 %
Beagles criados para este fin sensibilizados con AP	24	0	0 %
Perros mestizos- sin pulgas	30	0	0 %
Perros mestizos- infestados con pulgas	30	0	0 %
Animales sanos con dueño- múltiples razas	87	0	0 %
Dermatitis atópica de origen natural en animales con dueño - múltiples razas	224	128	57 %

^a Menos de 13 pg/ml está por debajo de los límites de cuantificación.

5 Los resultados del presente Ejemplo demuestran que la proteína IL-31 está elevada en un número significativo de perros con dermatitis atópica canina. Sin pretender ligarse a teoría alguna, se cree que la ruta de IL-31 desempeña un papel en la patobiología de las afecciones cutáneas alérgicas pruríticas tales como, pero sin limitación, dermatitis atópica canina y representa una nueva ruta para la intervención terapéutica con un antagonista de IL-31, tal como, incluyendo, pero sin limitación, olacitanib y/o un anticuerpo anti-IL-31 que se une de forma específica a IL-31 canina.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Pfizer Inc. Bammert, Gary F. Dunham, Steven A.
- <120> ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA INTERLEUCINA-31
- 15 <130> PC71750
- <150> 61/510.268
- <151> 21-07-2011
- 20 <160> 78
- <170> PatentIn versión 3.4
- 25 <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- 30 <400> 1
- Tyr Tyr Asp Ile Asn**
- 1 5**
- <210> 2
- <211> 5
- 35 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 2
- Ser Tyr Asp Met Ser**
- 1 5**
- 40 <210> 3
- <211> 5

ES 2 638 340 T3

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 3

Asn Tyr Gly Met Ser
1 5

10 <210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Thr Phe Lys
1 5 10 15

15 Gly

20 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

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

25 Gly

30 <210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

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

35 Gly

40 <210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 7

Ala Arg Gly Gly Thr Ser Val Ile Arg Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 8
<211> 11

ES 2 638 340 T3

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400>8

5

Ala Arg Gln Asn Trp Val Val Gly Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 9

Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr
1 5 10

15

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

20

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His
1 5 10 15

25

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 11

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

Ala

35

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Gly Leu Met His
1 5 10 15

45

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50

<400> 13

ES 2 638 340 T3

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

5
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

10

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

<400> 15

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

20

25
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr
1 5

30

35
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 17

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

40

45
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 18

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

50
<210> 19
<211> 111
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 638 340 T3

<400> 19

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Thr Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

5

<210> 20
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

15

<400> 20

ES 2 638 340 T3

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

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

10

<400> 21

ES 2 638 340 T3

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

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

5

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

10

ES 2 638 340 T3

Lys

5 <210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*
 <400> 23

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

15 <210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 24

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

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

ES 2 638 340 T3

Gly Thr Gly Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

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

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 25
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*
 <400> 25

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 638 340 T3

<400> 26

```

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Thr Phe
50          55          60

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

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

Ala Arg Gly Gly Thr Ser Val Ile Arg Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

5 <210> 27
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

<400> 27

ES 2 638 340 T3

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

<210> 28
 <211> 118
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 28

ES 2 638 340 T3

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

5 <210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

<400> 29

ES 2 638 340 T3

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

<210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 30

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

10

ES 2 638 340 T3

Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*
 <400> 31

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

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

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

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

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

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

Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 32
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

20 <400> 32

Met Leu Ser His Thr Gly Pro Ser Arg Phe Ala Leu Phe Leu Leu Cys
 1 5 10 15

ES 2 638 340 T3

Ser Met Glu Thr Leu Leu Ser Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu
 20 25 30

Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser
 35 40 45

Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu
 50 55 60

Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro
 65 70 75 80

Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro
 85 90 95

Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

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

Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser
 130 135 140

Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln
 145 150 155

<210> 33
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 33

atgctctccc acacaggacc atccaggttt gcctgttcc tgctctgctc tatggaaacc 60
 ttgctgtcct cccatatggc acccaccat cagctaccac caagtgatgt acgaaaaatc 120
 atcttggaaat tacagccctt gtcgagggga cttttggaag actatcagaa gaaagagaca 180
 ggggtgccag aatccaaccg taccttgetg ctgtgtctca cctctgattc ccaaccacca 240
 cgcctcaaca gctcagccat ctgtccttat ttcagggcaa tcagaccatt atcagataag 300
 aacattattg ataaaatcat agaacagctt gacaaactca aatttcaaca tgaaccagaa 360
 acagaaatth ctgtgcctgc agatactttt gaatgtaaaa gcttcatctt gacgatttta 420
 cagcagttct cggcgtgcct ggaaagtgtg ttaagtcac taaactctgg acctcag 477

10

<210> 34
 <211> 333

ES 2 638 340 T3

<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 34

5

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagtthttat gcactggtag 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggaga ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaataa ggatccgctc 300
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

<210> 35
<211> 363
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10

<400> 35

15

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaaa tactatgata taaactgggt gaggcagagg 120
cctgaacagg gacttgagtg gattggatgg atttttcctg gagatgggtg tactaagtag 180
aatgagacgt tcaagggcaa ggcacactg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcaggctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagagggggg 300
acttcgggtga taagggatgc tatggactac tggggctcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 36
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20

<400> 36

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga taaggtcact 60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtagcagc agaaaccatg gcagcctcct aaactgctga tctacggggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactotcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa 339

25

<210> 37
<211> 354
<212> ADN

ES 2 638 340 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 37

gaagtgaagc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgctttcagc agctatgaca tgtcttgggt togccagatt 120
 ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attactagtg gtggtgggta cacctactct 180
 gcagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaggaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccgtgt attattgtgc aagacaaaac 300
 tgggtcgtgg ggtagctta ttggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

5

<210> 38

<211> 333

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 38

gacattttgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccatc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgtcagt tttgctggta ctggtttaat gcactgggtac 120
 caacagaaac caggacagca acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaagct 180
 ggggttctta ccaggtttag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caatatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat ttctgtcagc aaagcaggga atatccgtgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

15

<210> 39

<211> 353

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 39

gaggtgcagt tggtaggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ctctttcagt aactatggca tgtcttgggt togccagact 120
 ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagttatg gtggtagtta cacctactat 180
 ccagacaata taaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgt aagggggtat 300
 ggttacgata ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc gag 353

25

<210> 40

<211> 331

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

30

<400> 40

ES 2 638 340 T3

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
1 5 10 15

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

ES 2 638 340 T3

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

ES 2 638 340 T3

275

280

285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300

Asp Pro Phe Thr Cys Ala Val Met His Glu Thr Leu Gln Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Asp Leu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 41
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 41

gcctccacca cggegeccctc ggttttccca ctggcccccga gctgcggggtc cacttccggc 60
 tccacgggtgg coctggcctg cctgggtgtca ggctacttcc ccgagcctgt aactgtgtcc 120
 tggaactccg gctccttgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgtccgtcct gcagtcctca 180
 gggcttcact ccctcagcag catgggtgaca gtgccctcca gcaggtggcc cagcagagacc 240
 ttcacctgca acgtgggtcca cccagccagc aacactaaag tagacaagcc agtgttcaat 300
 gaatgcagat gcaactgatac acccccatgc ccagtcctctg aacctctggg agggccttcg 360
 gtcctcatct ttcccccgaa acccaaggac atcctcagga ttaccggaac acccgaggtc 420
 acctgtgtgg tgttagatct gggccgtgag gaccctgagg tgcagatcag ctggttcgtg 480
 gatggtaagg aggtgcacac agccaagacc cagtctcgtg agcagcagtt caacggcacc 540
 taccgtgtgg tcagcgtcct cccattgag caccaggact ggctcacagg gaaggagttc 600
 aagtgcagag tcaaccacat agacctccg tctcccatcg agaggaccat ctctaaggcc 660
 agagggaggg ccataagcc cagtgtgtat gtcctgccgc catccccaaa ggagttgtca 720
 tccagtgaca cagtcagcat cacctgcctg ataaaagact tctaccacc tgacattgat 780
 gtggagtggc agagcaatgg acagcaggag cccgagagga agcaccgcat gacccccgcc 840
 cagctggacg aggacgggtc ctacttctctg tacagcaagc tctctgtgga caagagccgc 900
 tggcagcagg gagaccctt cacatgtgcg gtgatgcatg aaactctaca gaaccactac 960
 acagatctat ccctctccca ttctccgggt aaa 993

10

<210> 42
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

15

<400> 42

ES 2 638 340 T3

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys
100 105 110

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu
130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln
145 150 155 160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln
165 170 175

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
180 185 190

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys
195 200 205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser
225 230 235 240

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys
245 250 255

ES 2 638 340 T3

Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln
 260 265 270

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu
 275 280 285

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg
 290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 325 330 335

<210> 43
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 43

gcctcaacaa ctgctcctag cgtgtttccc ctggccccta gctgcggaag tacctcaggc 60
 agcacagtgg ccctggcttg tctggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt 120
 tggaaacagcg gctctctgac ctccgggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt 180
 ggccctgtact ccctgtcaag catggtgact gtgccttcct ctaggtggcc atcagaaact 240
 ttcacctgca acgtggocca tccggccagc aagaccaaag tggacaagcc cgtgcctaaa 300
 agggagaatg gaagggtgcc aagaccacct gattgcccta agtgtccagc tccagaaatg 360
 ctgggaggac caagcgtgtt catctttcca cccaagcca aagacacact gctgattgct 420
 agaactcccg aggtgacctg cgtggtggtg gacctggatc cagaggacct cgaagtgcag 480
 atctcctggt tcgtggatgg gaagcagatg cagacagcca aaactcagcc tcgggaggaa 540
 cagtttaacg gaacctatag agtgggtgtct gtgctgocaa ttggacacca ggactggctg 600
 aagggcaaac agtttacatg caaggtgaac aacaaggccc tgcctagtcc aatcgagagg 660
 actatttcaa aagctagggg acaggctcat cagccttccg tgtatgtgct gcctccatcc 720
 cgggaggaac tgtctaagaa cacagtgagt ctgacttgtc tgatcaaaga tttctttccc 780
 cctgacattg atgtggagtg gcagagcaat gggcagcagg agccagaatc caagtacaga 840
 accacaccac ccagctgga cgaagatggc tcctatttcc tgtacagtaa gctgtcagtg 900
 gacaaatcta ggtggcagcg cggggatacc tttatctgog ccgtgatgca cgaggctctg 960
 cacaatcatt acacacaaga aagtctgtca catagccccg gcaag 1005

10

ES 2 638 340 T3

<210> 44
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 44

```

Arg Asn Asp Ala Gln Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp
1          5          10          15

Gln Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Ser Phe
          20          25          30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Ile Gln
          35          40          45

Asp Thr Gly Ile Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Lys Asp Ser Thr
          50          55          60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Leu Ser
65          70          75          80

His Glu Leu Tyr Ser Cys Glu Ile Thr His Lys Ser Leu Pro Ser Thr
          85          90          95

Leu Ile Lys Ser Phe Gln Arg Ser Glu Cys
          100          105
    
```

10 <210> 45
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*

15 <400> 45

```

aggaacgacg cccagcctgc tgtgtatctg tttcagccct cccctgatca gctgcacact      60
ggctctgcta gtgtggtgtg tctgctgaac agcttctacc caaaggatat caatgtgaag      120
tggaaagtgg acggcgtgat ccaggataact gggattcagg agtccgtgac cgaacaggac      180
aaagattcaa catatagcct gagctccact ctgacatgt ctagtaccga gtacctgagc      240
cacgaactgt attcctgcga gatcactcat aagtccttgc cctctaccct gatcaagagc      300
ttccagagat cagagtgt                                     318
    
```

20 <210> 46
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

ES 2 638 340 T3

<400> 46

gagatcgtga tgacccagag ccccgccagc ctgagcctga gccaggaaga gaaagtcacc 60
 atcacatgca agagcagcca gagcctgctg aacagcggca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccaggccccc aagctgctga tctacggcgc cagcaccgcg 180
 gagagcggcg tgccaagcag atttccggc agcggctccg gcaccgactt cagcttcacc 240
 atcagcagcc tggaaccoga ggacgtggcc gtgtactact gccagaacga ctacagctac 300
 ccctacacct tcggccaggg taccaagctg gagatcaag 339

5 <210> 47
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

15 <400> 47

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctgggtcaagc ctggcggcag cctgagactg 60
 agctgtgtgg ccagcggctt caccttcagc agctacgaca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gactgcagtg ggtggccacc atcaccagcg gcggaggcta cacctacagc 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgcccggaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gagcggaggac accgccgtgt actactgcbc cagacagaac 300
 tgggtcgtgg gcctggccta ctggggccag ggaacactcg tgaccgtctc gage 354

20 <210> 48
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

<400> 48

gagatcgtga tgacccagag ccccgccagc ctgagcctga gccaggaaga gaaagtcacc 60
 atcacatgca aggccagcca gagcgtgtcc ttcgcccggca caggcctgat gcactggtat 120
 cagcagaagc ccggccaggc ccccaagctg ctgatctacc gggccagcaa cctggaagcc 180
 ggcgtgccaa gcagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcagctt caccatcagc 240
 agcctcgaac ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc agagcagaga gtacccttgg 300
 accttcggcc agggtaacaa gctggagatc aag 333

30

ES 2 638 340 T3

<210> 49
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

10 <400> 49

gaggtgcagc	tggtggaatc	tggcggcgac	ctggtcaagc	ctggcggcag	cctgagactg	60
agctgtgtgg	ccagcggcctt	caccttcagc	aactacggca	tgagctgggt	ccgacaggcc	120
cctggcaagg	gactgcagtg	ggtggccacc	atcagctacg	gcggcagcta	cacctactac	180
cccgacaaca	tcaagggccg	gttcaccatc	agccgggaca	acgccaagaa	caccctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgcg	ggccgaggac	accgccatgt	actactgcgt	gcggggctac	300
ggctacgaca	caatggacta	ctggggccag	ggcaccctcg	tgaccgtctc	gagc	354

<210> 50
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 20 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

<400> 50

gatatagtga	tgacacaaac	tcctctcagt	ctttccgtat	caccgggaga	accggcttcc	60
atttcctgtc	gggcctcaga	gtctgtggac	aactacggga	tatccttcat	gcactggtat	120
cagcagaaac	ccggccagcc	ccctaaactc	cttatttaca	gggccagtaa	tctggaaagc	180
ggtgtgcccc	atcgatttag	cggttccggg	agcggcacag	atttcaccct	gcgaatctct	240
agagttgaag	cggatgatgc	aggagtatat	tactgccagc	aatccaataa	ggatccccct	300
acattcggcg	cgggtaccaa	gctggagatc	aag			333

25 <210> 51
 <211> 363
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena pesada variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

35 <400> 51

ES 2 638 340 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg 60
 tcctgcaaga ccagcggcta caccttcaag tactacgaca tcaactgggt ccgacaggcc 120
 cctggcgccg gactggattg gatgggctgg atcttccccg gcgacggcgg caccaagtac 180
 aacgagacat tcaagggcag agtgaccctg accgccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag agccggcgat atcgctgtgt actactgcgc cagagggcggc 300
 accagcgtga tccgggacgc tatggactac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtctcg 360

agc 363

5 <210> 52
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

<400> 52

gacattgta tgactcagac gccctgagc ctgagcgtct cccccggcga gcccgctagt 60
 attagttgcc gggcatccga gtcagtgagc aattatggca tcagctttat gcattggttt 120
 cagcagaaac caggtcagtc ccctcaactc ctgatttaca gagcttccaa tctggaatca 180
 ggcgttcctg acagatttag cggatcaggc tccgggacag atttcaccct gcgcatcagt 240
 cgcgtggaag ccgatgacgc aggcgtctat tattgtcaac agtccaacaa ggatcccctt 300
 acattcggag ccggtaccaa gctggagatc aag 333

15 <210> 53
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

25 <400> 53

ES 2 638 340 T3

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
          20           25           30

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
          35           40           45

Gln Arg Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50           55           60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser
65           70           75           80

Arg Val Glu Ala Asp Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85           90           95

Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

```

100 105 110

- 5 <210> 54
- <211> 333
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable caninizada, de *Mus musculus* y *Canis*

- <400> 54

- gacatcgtga tgaccagac cccctgagc ctgagcgtgt ccctggcga gctgccagc 60
- atcagctgca gagccagcga gagcgtggac aactacggca tcagcttcat gcaactggttc 120
- cagcagaagc cggccagag ccccagcgg ctgatctaca gagccagcaa cctggaaagc 180
- ggcgtgcccg atcggtttag cggctctggc agcggcaccg acttcaccct gcggatctct 240
- cgggtggaag ccgatgacgc cggagtgtac tactgccagc agagcaacaa ggacccctg 300
- acctttggcg ccggtaccaa gctggagatc aag 333

- 15 <210> 55
- <211> 148
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> Proteína IL-31 de canino de longitud completa codificada por la secuencia de nucleótidos con codones optimizados

- 25 <400> 55

ES 2 638 340 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ser His Met Ala
 1 5 10 15

Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile Leu Glu
 20 25 30

Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Lys Glu
 35 40 45

Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu Thr Ser
 50 55 60

Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr Phe
 65 70 75 80

Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile Ile
 85 90 95

Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu Ile
 100 105 110

Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile
 115 120 125

Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu Asn
 130 135 140

Ser Gly Pro Gln
 145

- 5 <210> 56
- <211> 444
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica la proteína IL-31 de canino de longitud completa
- <400> 56

ES 2 638 340 T3

```

atgagaggat cccatcacca tcaccaccac ggctcatctc atatggctcc tactcaccaa      60
ttaccaccct ccgatgtccg taaaattatt ctcgaattac aacctttatc ccgcggctctg    120
ctcgaagatt accaaaaaaaa agaaacaggc gtcccagaaa gcaaccgtac attactcctt    180
tgccttacct ccgattccca accacctcgt cttaactcat cagccattct cccttatttc    240
cgtgccattc gccctctttc tgataaaaaat attattgaca aaattattga acaactcgac    300
aaattaaaaat tccaacacga acccgaaacc gaaatctccg tacctgccga tacctttgaa    360
tgcaaatcct ttatcctcac tattttacaa caattctccg catgtctcga atccgtcttc    420
aaatctctca attccggtcc acag                                             444

```

5 <210> 57
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-20N)

<400> 57

```

Met Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln
 1           5           10           15

Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys
          20           25           30

Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu
          35           40           45

```

ES 2 638 340 T3

Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp
 50 55 60

Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile
 85 90 95

Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys
 100 105 110

Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
 130 135 140

Gly His His His His His His
 145 150

5 <210> 58
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-20N)
 <400> 58

atgctcgaat tacaacctt atccgcgggt ctgctcgaag attaccaaaa aaaagaaaca 60

ggcgtcccag aaagcaaccg tacattactc ctttgcotta cctccgattc ccaaccacct 120

cgtcttaact catcagccat tctccottat ttcogtgoca ttogccctct ttctgataaa 180

aatattattg acaaaattat tgaacaactc gacaaattaa aattccaaca cgaaccggaa 240

accgaaatct ccgtacctgc cgataccttt gaatgcaaat cctttatcct cactatttta 300

caacaattct ccgcatgtct cgaatccgtc ttcaaactct tcaattccgg tccacagaag 360

ggcgagctca attcgaagct tgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat 420

tctacgcgta ccggatcatca tcaccatcac cattga 456

15 <210> 59
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-40N)

ES 2 638 340 T3

<400> 59

Met Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu Thr Ser Asp
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Arg
 20 25 30

Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu
 35 40 45

Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu Ile Ser
 50 55 60

Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu
 65 70 75 80

Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser
 85 90 95

Gly Pro Gln Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile
 100 105 110

Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His
 115 120 125

His His His
 130

5 <210> 60
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-40N)

<400> 60

atggtcccag aaagcaaccg tacattactc ctttgcctta cctccgattc ccaaccacct 60

cgtcttaact catcagccat tctcccttat ttccgtgccca ttccgacctct ttctgataaa 120

aatattattg acaaaattat tgaacaactc gacaaattaa aattccaaca cgaaccggaa 180

accgaaatct ccgtacctgc cgataccttt gaatgcaaat cctttatcct cactatttta 240

caacaattct ccgcatgtct cgaatccgtc ttcaaactctc tcaattccgg tccacagaag 300

ggcgagctca attcgaagct tgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggtcwogat 360

tctacgcgta ccggtcatca tcaccatcac cat 393

15

ES 2 638 340 T3

<210> 61
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-60N)

10 <400> 61

```

Met Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro
 1           5           10           15

Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys
 20           25           30

Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp
 35           40           45

Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser
 50           55           60

Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln Lys
 65           70           75           80

Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu
 85           90           95

Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
 100          105          110
    
```

<210> 62
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 20 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento N-terminal (-60N)

<400> 62

```

atgcttaact catcagccat tctcccttat ttccgtgcca ttgcgcctct ttctgataaa      60
aatattattg acaaaattat tgaacaactc gacaaattaa aattccaaca cgaaccogaa      120
accgaaatct ccgtaacctgc cgataccttt gaatgcaaat cctttatcct cactatttta      180
caacaattct cgcgatgtct cgaatcogtc ttcaaatoct tcaattcogc tocacagaag      240
ggcgagctca attcgaagct tgaaggtaag cctatoccta acocctcctc cggctctcgat      300
tctacgcgta cgggtcatca tcacatcac cat                                     333
    
```

25 <210> 63

ES 2 638 340 T3

<211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde con la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-122

10 <400> 63

```

Met Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln
 1                               5                               10                               15

Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys
                20                               25                               30

Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu
                35                               40                               45

Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp
 50                               55                               60

Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu
 65                               70                               75                               80

Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile
                85                               90                               95

Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu
                100                              105                              110

Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg
                115                              120                              125

Thr Gly His His His His His His
 130                               135
    
```

15 <210> 64
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-122

<400> 64

ES 2 638 340 T3

```

atgctcgaat tacaaccttt atccccgcggt ctgctcgaag attaccaaaa aaaagaaaca      60
ggcgtcccag aaagcaaccg tacattactc ctttgcetta cctccgattc ccaaccacct      120
cgtcttaact catcagccat tctcccttat ttcogtgcca ttgcacctct ttctgataaa      180
aatattattg acaaaattat tgaacaactc gacaaattaa aattccaaca cgaacccgaa      240
accgaaatct ccgtacctgc cgataccttt gaatgcaaat cctttatcct cactatttta      300
caacaattct ccaagggcga gctcaattcg aagcttgaag gtaagcctat ccctaaccct      360
ctcctcggtc tcgattctac gcgtaccggt catcatcacc atcaccattg a              411
    
```

5 <210> 65
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde con la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-100

<400> 65

```

Met Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln
 1           5           10           15

Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys
 20           25           30

Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu
 35           40           45

Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp
 50           55           60

Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu
 65           70           75           80

Thr Glu Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro
 85           90           95

Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His
 100          105          110

His His
    
```

15 <210> 66
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

ES 2 638 340 T3

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-100

5 <400> 66

```

atgctcgaat tacaaccttt atcccgcggt ctgctcgaag attaccaaaa aaaagaaaca      60
ggcgtcccag aaagcaaccg tacattactc ctttgcotta cctccgattc ccaaccacct      120
cgtcttaact catcagccat tctcccttat ttccgtgcca ttccgacctt ttctgataaa      180
aatattattg acaaaattat tgaacaactc gacaaattaa aattccaaca cgaacccgaa      240
accgaaaagg gcgagctcaa ttcgaagctt gaaggtaagc ctatccctaa ccctctcctc      300
ggtctcgaat ctacgcgtac cggtcacatc caccatcacc attga                          345
    
```

<210> 67

10 <211> 94

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos que corresponde con la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-80

<400> 67

```

Met Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln
 1                               5                               10                               15

Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys
                20                               25                               30

Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu
                35                               40                               45

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

Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu
 65                               70                               75                               80

Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
                85                               90
    
```

20

<210> 68

<211> 285

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína IL-31 de canino con truncamiento C-terminal en las posiciones 20-80

30

<400> 68

ES 2 638 340 T3

atgctcgaat tacaaccttt atccccgCGGT ctgctcgaag attaccaaaa aaaagaaaca 60
 ggCGTcccag aaagcaaccg tacattactc ctttgcctta cctccgattc ccaaccacct 120
 cgtcttaact catcagccat tctcccttat ttccgtgcca ttccgacctct ttctgataaa 180
 aatattaagg gcgagctcaa ttCGAagctt gaaggtaagc ctatccctaa cctctctctc 240
 ggtctcgatt ctacgcgtac cggTcatcat caccatcacc attga 285

5 <210> 69
 <211> 444
 <212> ADN
 <213> *Felis catus*

<400> 69

atgagaggat cccatcacca tcaccaccac ggctcatctc atatggcccc cgcacatcgc 60
 ctgcagccga gtgacattcg taaaattatc ttggagctgc gcccgatgtc caagggctta 120
 ctgcaggatt atctgaagaa agagatcggg ctgcctgaaa gcaaccatag tagcctgccg 180
 tgtttatcgt ctgatagoca gttaccacac atcaatggct ctgcgatttt gccctacttt 240
 cgcgccatcc gtcCGctgtc cgataaaaat accatcgaca aaattatcga acaactggat 300
 aaattgaagt ttCagcgoga gcctgaagcg aaagtttcga tgccagcmga taacttcgaa 360
 cgcaaaaact ttatTTtagc ggtgTtgcag cagTtttctg cctgtctgga acacgtgctc 420
 cagTcactca atagtgggcc acaa 444

10
 15 <210> 70
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Felis catus*

<400> 70

ES 2 638 340 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ser His Met Ala
 1 5 10 15

Pro Ala His Arg Leu Gln Pro Ser Asp Ile Arg Lys Ile Ile Leu Glu
 20 25 30

Leu Arg Pro Met Ser Lys Gly Leu Leu Gln Asp Tyr Leu Lys Lys Glu
 35 40 45

Ile Gly Leu Pro Glu Ser Asn His Ser Ser Leu Pro Cys Leu Ser Ser
 50 55 60

Asp Ser Gln Leu Pro His Ile Asn Gly Ser Ala Ile Leu Pro Tyr Phe
 65 70 75 80

Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Thr Ile Asp Lys Ile Ile
 85 90 95

Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln Arg Glu Pro Glu Ala Lys Val
 100 105 110

Ser Met Pro Ala Asp Asn Phe Glu Arg Lys Asn Phe Ile Leu Ala Val
 115 120 125

Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu His Val Leu Gln Ser Leu Asn
 130 135 140

Ser Gly Pro Gln
 145

5 <210> 71
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena ligera variable felinizada, de *Mus musculus* y *Felis catus*

<400> 71

ES 2 638 340 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Gly Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 72
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena ligera variable felinizada, de *Mus musculus* y *Felis catus*

<400> 72

gagattcaaa tgaccagag tcctagctca ctgagcgcat caccgggga ccgcgtgacc 60
 atcacgtgca aggcattctca gtccgtgtca ttcgctggaa ccggtctgat gcaactggtat 120
 cagcaaaaac cagggaaagt ccctaaactg ctgatctatc ggcctccaa tcttgaggcc 180
 ggggtgccat ctcggttctc tggtagcggc agcggaactg actttaccct gacaatctcc 240
 tcaactcgagc ctgaagacgc cgccacctac tactgtcaac agtccagaga atacccatgg 300
 acctttggac agggtagcaa gctggagatc aaa 333

15 <210> 73
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de Acm de la cadena pesada variable felinizada, de *Mus musculus* y *Felis catus*

25 <400> 73

ES 2 638 340 T3

```

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

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

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

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

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

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

Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

```

5 <210> 74
  <211> 354
  <212> ADN
  <213> Artificial

10 <220>
  <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de Acm de la cadena pesada variable felinizada, de
  Mus musculus y Felis catus

  <400> 74

  gacgtgcaac tggtcgaaag cggaggcgat cttgtgaagc caggtgggag tctccggctc      60
  acatgcggtg cctctggctt tacctacagc aactacggga tgagttgggt tcgccaggca      120
  ccaggaaagg gcttgcaatg ggtggccact ataagctatg gtgggtccta tacctactac      180
  cctgataata tcaaggggag attcactatt tcccgcgaca atgctaagaa tactctctac      240
  ctccagatga atagcctgaa gactgaggat accgctacct actattgcgt gcgcggetac      300
  ggctacgata ccatggacta ctggggacag ggaacccttg tcaactgtctc gagg          354

15 <210> 75
  <211> 335
  <212> PRT
  <213> Felis catus

20 <400> 75

```

ES 2 638 340 T3

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ala Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Leu Ser Asp Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Arg Lys Thr Asp His Pro Pro Gly Pro Lys Pro Cys Asp Cys
 100 105 110

Pro Lys Cys Pro Pro Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Ile Phe Ile
 115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 130 135 140

Val Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Gly Pro Asp Asp Ser Asp Val Gln
 145 150 155 160

Ile Thr Trp Phe Val Asp Asn Thr Gln Val Tyr Thr Ala Lys Thr Ser

ES 2 638 340 T3

				165						170						175
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
			180					185					190			
Pro	Ile	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Lys	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	
		195					200					205				
Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	
	210					215					220					
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	His	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Ala	
225					230					235					240	
Gln	Glu	Glu	Leu	Ser	Arg	Asn	Lys	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Leu	Ile	Lys	
				245					250					255		
Ser	Phe	His	Pro	Pro	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ile	Thr	Gly	Gln	
			260					265					270			
Pro	Glu	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Arg	Thr	Thr	Pro	Pro	Gln	Leu	Asp	Ser	
		275					280					285				
Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	His	
	290					295					300					
Trp	Gln	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	His	Glu	Ala	Leu	
305					310					315					320	
His	Ser	His	His	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys		
				325					330					335		

<210> 76
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> *Felis catus*

 <400> 76

5

ES 2 638 340 T3

gcctccacca cggccccatc ggtgttccca ctggccccca gctgcgggac cacatctggc 60
gccaccgtgg ccctggcctg cctgggtgta ggctacttcc ctgagccggg gaccgtgtcc 120
tggaaactccg gcgcacctgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgcccgctct gcaggcctcg 180
gggctgtact ctctcagcag catgggtgaca gtgccctcca gcagggtggct cagtgcacacc 240
ttcacctgca acgtggccca cccgcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtgcgcaaa 300
acagaccacc caccgggacc caaacctgc gactgtccca aatgccacc ccctgagatg 360
cttgaggagc cgtccatctt catcttcccc ccaaaacca aggacacct ctcgatttcc 420
cggacgcccg aggtcacatg cttgggtggg gacttgggcc cagatgactc cgatgtccag 480
atcacatggt ttgtggataa caccaggtg tacacagcca agacgagtcc gcgtgaggag 540
cagttcaaca gcacctaccg tgtggtcagt gtccctccca tcctacacca ggactggctc 600
aaggggaagg agttcaagtg caaggtcaac agcaaatccc tcccctcccc catcgagagg 660
accatctcca aggccaaagg acagccccac gagccccagg tgtacgtcct gcctccagcc 720
caggaggagc tcagcaggaa caaagtcagt gtgacctgcc tgatcaaate cttccacccg 780
cctgacattg ccgtcgagtg ggagatcacc ggacagccgg agccagagaa caactaccgg 840
acgacccccg cccagctgga cagcgacggg acctacttcg tgtacagcaa gctctcgggtg 900
gacaggtccc actggcagag gggaaacacc tacacctgct cgggtgtcaca cgaagctctg 960
cacagccacc acacacagaa atccctcacc cagtctccgg gtaaa 1005

<210> 77
<211> 110
<212> PRT
<213> *Felis catus*
<400> 77

5

ES 2 638 340 T3

Arg Ser Asp Ala Gln Pro Ser Val Phe Leu Phe Gln Pro Ser Leu Asp
 1 5 10 15

Glu Leu His Thr Gly Ser Ala Ser Ile Val Cys Ile Leu Asn Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Glu Val Asn Val Lys Trp Lys Val Asp Gly Val Val Gln
 35 40 45

Asn Lys Gly Ile Gln Glu Ser Thr Thr Glu Gln Asn Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Met Ser Ser Thr Glu Tyr Gln
 65 70 75 80

Ser His Glu Lys Phe Ser Cys Glu Val Thr His Lys Ser Leu Ala Ser
 85 90 95

Thr Leu Val Lys Ser Phe Asn Arg Ser Glu Cys Gln Arg Glu
 100 105 110

<210> 78
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> *Felis catus*

5

<400> 78

cgagtgatg ctcagccatc tgtctttctc ttccaacccat ctctggacga gttacataca 60

ggaagtgcct ctatcgtgtg catattgaat gacttctacc ccaaagaggt caatgtcaag 120

tggaaagtgg atggcgtagt ccaaaacaaa ggcacccagg agagcaccac agagcagaac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacga tgtccagtac ggagtaccaa 240

agtcatgaaa agttctcctg cgaggtcact cacaagagcc tggcctccac cctcgtcaag 300

agcttcaaca ggagcgagtg tcagagagag 330

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une de forma específica a IL-31 de perro, en el que dicho anticuerpo reduce, inhibe o neutraliza la señalización de pSTAT mediada por IL-31 de perro en un ensayo basado en células.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 5 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es quimérico.
4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es caninizado.
5. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la porción de unión a antígeno del mismo que comprende al menos uno del grupo que consiste en:
 - 10 una región determinante de complementariedad (CDR)1 de cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11 E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
 - una CDR2 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
 - 15 una CDR3 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11 E12- VH-CDR3), ARQNWVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03- VH-CDR3); y
 - una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.
- 20 6. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la porción de unión a antígeno del mismo que comprende al menos uno del grupo que consiste en:
 - una cadena ligera variable (V_L) que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 que tiene la secuencia de aminoácidos RASESVDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11E12-VL-CDR1), KSSQSLNLSGNOKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);
 - 25 una CDR2 de cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-CDR2);
 - una CDR3 de cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y
 - 30 una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6 que comprende adicionalmente al menos uno del grupo que consiste en:
 - 35 una región determinante de complementariedad (CDR)1 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11 E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
 - una CDR2 de cadena pesada variable que tienen la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID NO: 4; 11 E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o TISYGGSYTYPPDNIKG (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
 - 40 una CDR3 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO: 7; 11 E12-VH-CDR3), ARQNWVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9; 34D03-VH-CDR3); y
 - una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3.
- 45 8. El anticuerpo de la reivindicación 7 que comprende al menos uno del grupo que consiste en:
 - a) una cadena ligera variable que comprende
 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPLLIYRASNLE
 SGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEDDDVATYYCQQSNKDPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 19; MU-11 E12- VL),
 DIVMTQTPLSLVSPGEPASISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPLLIYRASNLE
 50 SGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 20; CAN-11 E12-
 VL-cUn-FW2),
 DIVMTQTPLSLVSPGEPASISCRASESVDNYGISFMHWFQKPGQSPQLLIYRASNLE
 SGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 21; CAN-11 E12-
 VL-cUn-13),
 55 DIVMSQSPSSLSVSAGDKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKQPWQPPLLIYGA
 STRESGVPDRFTGSGSDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 22; MU-

- 19D07-VL),
 EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKSSQSLNNSGNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYGAST
 RESGVPSRFSGSGSGTDFSFSTISSLEPEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 23; CAN- 19D07-
 VL-998-1),
 5 DILLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLE
 AGVPTRFSGSGSRTDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 24; MU-34D03- VL)
 o
 EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKASQSVSFAGTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLE
 10 AGVPTRFSGSGSGTDFSFSTISSLEPEDVAVYYCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 25; CAN-34D03- VL-
 998-1);
 b) una cadena pesada variable que comprende
 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFKYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGG
 TKYNETFKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARGGTSVIRDAMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:
 26; MU-11E12-VH),
 15 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYTFKYDINWVRQAPGAGLDWMGWIFPGDGG
 GTKYNETFKGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRAGDIAYVYFCARGGTSVIRDAMDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:
 27; CAN-11E12-VH-415-1),
 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFASFSSYDMSWVRQIPEKRLEWVATITSGGGYT
 20 YSADSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDVAVYFCARQWVWVGLAYWGQGTLV VSA (SEQ ID NO: 28; MU-
 19D07-VH),
 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLQWVATITSGGGY
 TYSADSVKGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDVAVYFCARQWVWVGLAYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 29;
 CAN-19D07-VH-400-1),
 25 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFSSNYGMSWVRQTPDKRLEWVATISYGGSY
 TYYPDNIKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGT SV TVSS (SEQ ID NO: 30;
 MU-34D03-VH), o
 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSNYGMSWVRQAPGKGLQWVATISYGGY
 YTYYPDNIKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGT V TVSS (SEQ ID NO: 31;
 CAN-34D03-VH-568-1); y
 30 c) variantes de las mismas que tienen una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo comprende al menos uno del grupo que consiste en:

- a) una cadena ligera variable que comprende
 35 DILLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLE
 AGVPTRFSGSGSRTDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 24; MU-34D03- VL),
 o
 EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKASQSVSFAGTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLE
 AGVPTRFSGSGSGTDFSFSTISSLEPEDVAVYYCQQSREYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 25; CAN-34D03- VL-
 998-1);
 40 b) una cadena pesada variable que comprende
 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSNYGMSWVRQAPGKGLQWVATISYGGY
 YTYYPDNIKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGT V TVSS (SEQ ID NO: 31;
 CAN-34D03-VH-568-1); y
 45 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFSSNYGMSWVRQTPDKRLEWVATIS
 YGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID
 NO: 30; MU-34D03-VH), o
 c) variantes de las mismas que tienen una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

10. Una composición veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

50 11. Una célula hospedadora que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno del grupo que consiste en:

- una región determinante de complementariedad (CDR)1 de cadena pesada variable (V_H) que tiene la secuencia
 de aminoácidos YYDIN (SEQ ID NO: 1; 11 E12-VH-CDR1), SYDMS (SEQ ID NO: 2; 19D07-VH-CDR1) o
 55 NYGMS (SEQ ID NO: 3; 34D03-VH-CDR1);
 una CDR2 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos WIFPGDGGTKYNETFKG (SEQ ID
 NO: 4; 11 E12-VH-CDR2), TITSGGGYTYSADSVKG (SEQ ID NO: 5; 19D07-VH-CDR2) o
 TISYGGSYTYYPDNIK (SEQ ID NO: 6; 34D03-VH-CDR2);
 una CDR3 de cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos ARGGTSVIRDAMDY (SEQ ID NO:
 60 7; 11E12- VH-CDR3), ARQNWVWVGLAY (SEQ ID NO: 8; 19D07-VH-CDR3) o VRGYGYDTMDY (SEQ ID NO: 9;
 34D03- VH-CDR3); y

una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una de CDR1, CDR2 o CDR3, y comprende adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos uno del grupo que consiste en:

- 5 una cadena ligera variable (V_L) que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1 que tiene la secuencia de aminoácidos RASESVDNYGISFMH (SEQ ID NO: 10; 11 E12-VL-CDR1), KSSQSLNLSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 11; 19D07-VL-CDR1) o KASQSVSFAGTGLMH (SEQ ID NO: 12; 34D03-VL-CDR1);
 una CDR2 de cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos RASNLES (SEQ ID NO: 13; 11E12-VL-CDR2), GASTRES (SEQ ID NO: 14; 19D07-VL-CDR2) o RASNLEA (SEQ ID NO: 15; 34D03-VL-CDR2);
 10 una CDR3 de cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNKDPLT (SEQ ID NO: 16; 11E12-VL-CDR3), QNDYSYPYT (SEQ ID NO: 17; 19D07-VL-CDR3) o QQSREYPWT (SEQ ID NO: 18; 34D03-VL-CDR3); y
 una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácido conservativas en al menos una
 15 de CDR1, CDR2 o CDR3.

13. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.

14. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 en condiciones que dan como resultado la producción del anticuerpo y aislar el anticuerpo de la célula hospedadora o del medio de cultivo de la célula hospedadora.

20 15. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en terapia.

16. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno seleccionado de una afección prurítica o una afección alérgica, en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

25 17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 en el que la afección prurítica se selecciona del grupo que consiste en dermatitis atópica, eczema, psoriasis, esclerodermia y prurito.

18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que la afección pruriginosa es dermatitis atópica.

30 19. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 18 en el que la afección pruriginosa se **caracteriza por** picor.

20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 en el que la afección alérgica se selecciona del grupo que consiste en dermatitis alérgica, eczema estival, urticaria, ronchas, enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, obstrucción recurrente de las vías
 35 respiratorias, hiperrespuesta de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar de obstrucción crónica y procesos inflamatorios que son el resultado de la autoinmunidad.

21. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de un perro que lo necesite, inhibiendo la actividad de IL-31.

40 22. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el cual la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo se administra en un intervalo de dosificación de 0,1 – 10 mg de anticuerpo por kg de peso corporal de forma bisemanal o mensual.

23. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que el anticuerpo designado en el presente documento como CAN34D03-65 se administra por vía subcutánea a 1,0 mg/kg, en el que CAN34D03-65 está representado por SEQ ID NO: 31 (VH) emparejado con SEQ ID NO: 25 (VL) en SEQ ID NO: 42 (HC-65) y SEQ ID NO: 44 (LC-Kappa).
 45

24. Un procedimiento de detección o cuantificación de IL-31 en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- (a) incubar una muestra clínica o biológica que contenga IL-31 en presencia de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
 (b) detectar en la muestra el anticuerpo que está unido a IL-31.

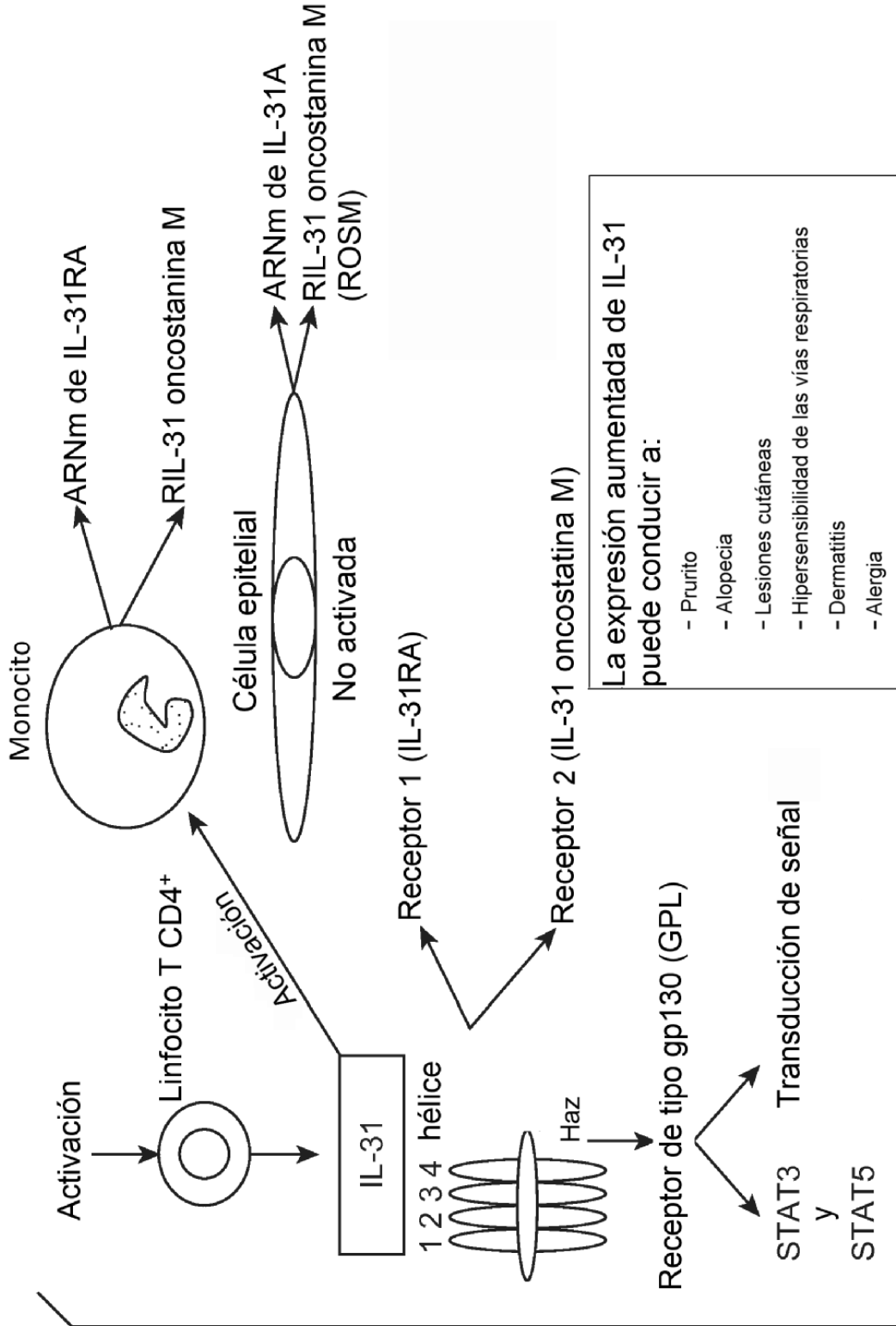
50 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo está marcado de forma detectable.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el anticuerpo no está marcado y se utiliza en combinación con un segundo anticuerpo que está marcado de forma detectable.

27. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se une de forma específica a una región entre los restos de aminoácidos 95 y 125 de la secuencia de aminoácidos de IL-31 canina de SEQ ID NO: 32.

5 28. El anticuerpo de la reivindicación 27, en el que el anticuerpo se une de forma específica a una región entre los restos de aminoácidos 102 y 122 de la secuencia de IL-31 canina de SEQ ID NO: 32.

FIG. 1



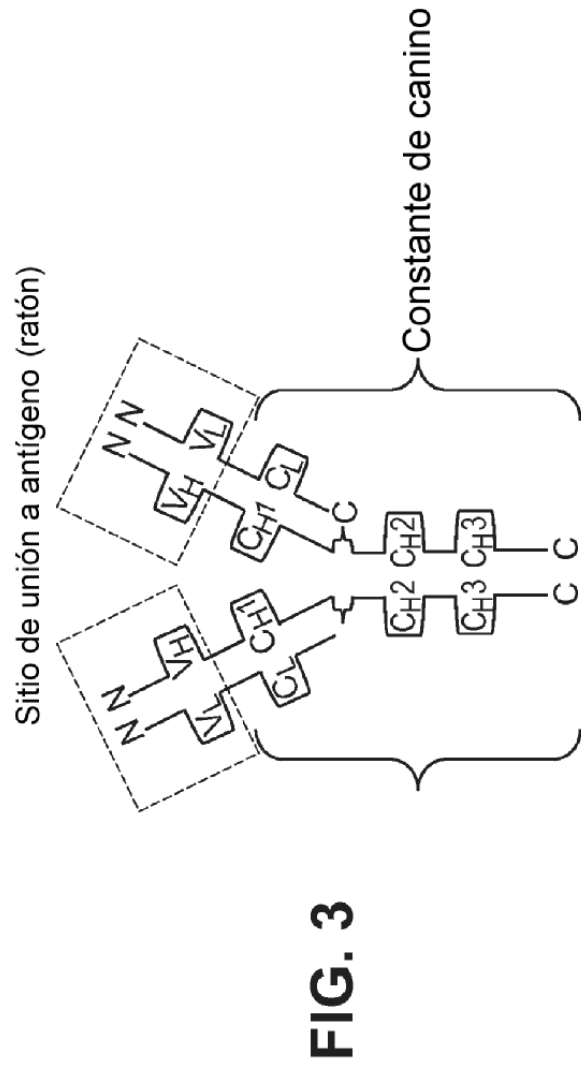
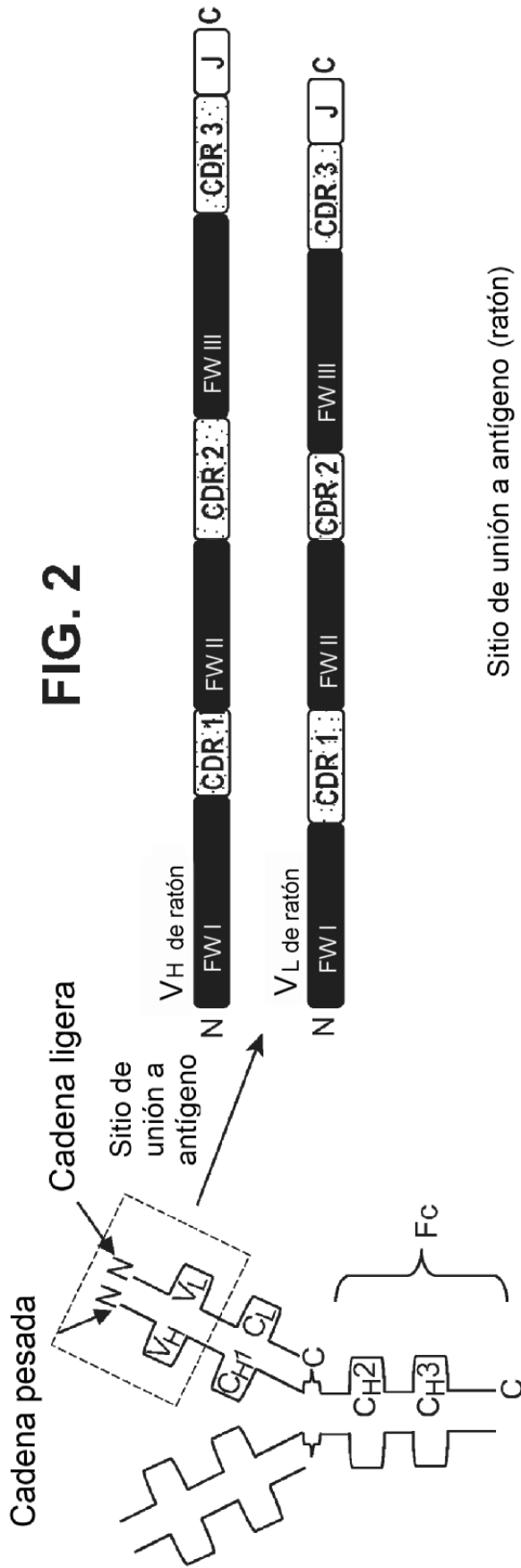


FIG. 4

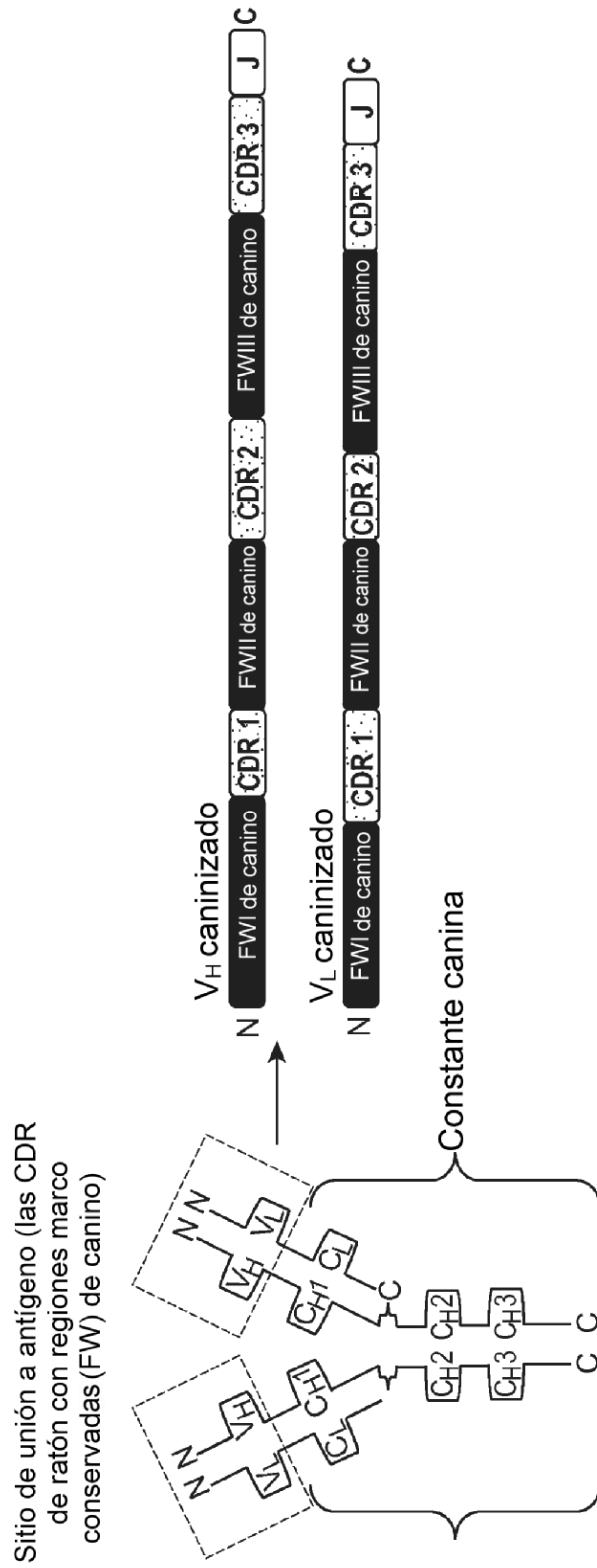


FIG. 5

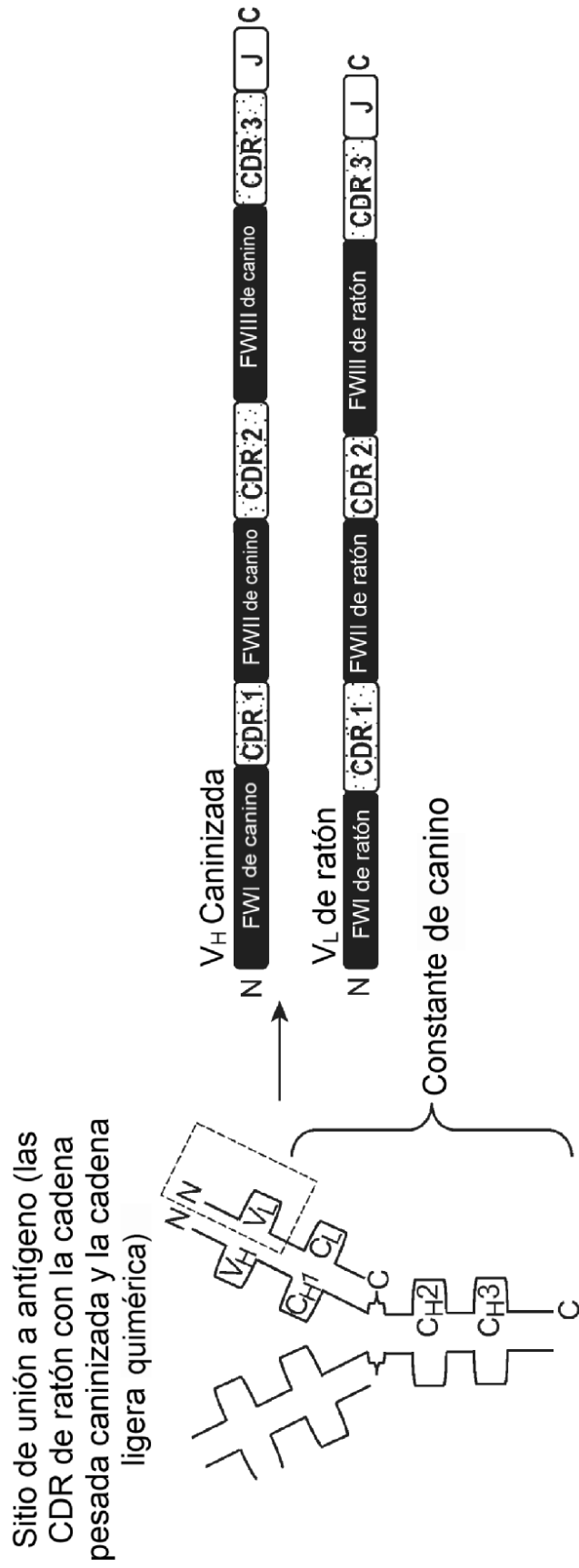


FIG. 6

Desarrollo de un anticuerpo monoclonal para la reactividad por ELISA de un antisuero de ratón CF-1 contra IL-31 de canino

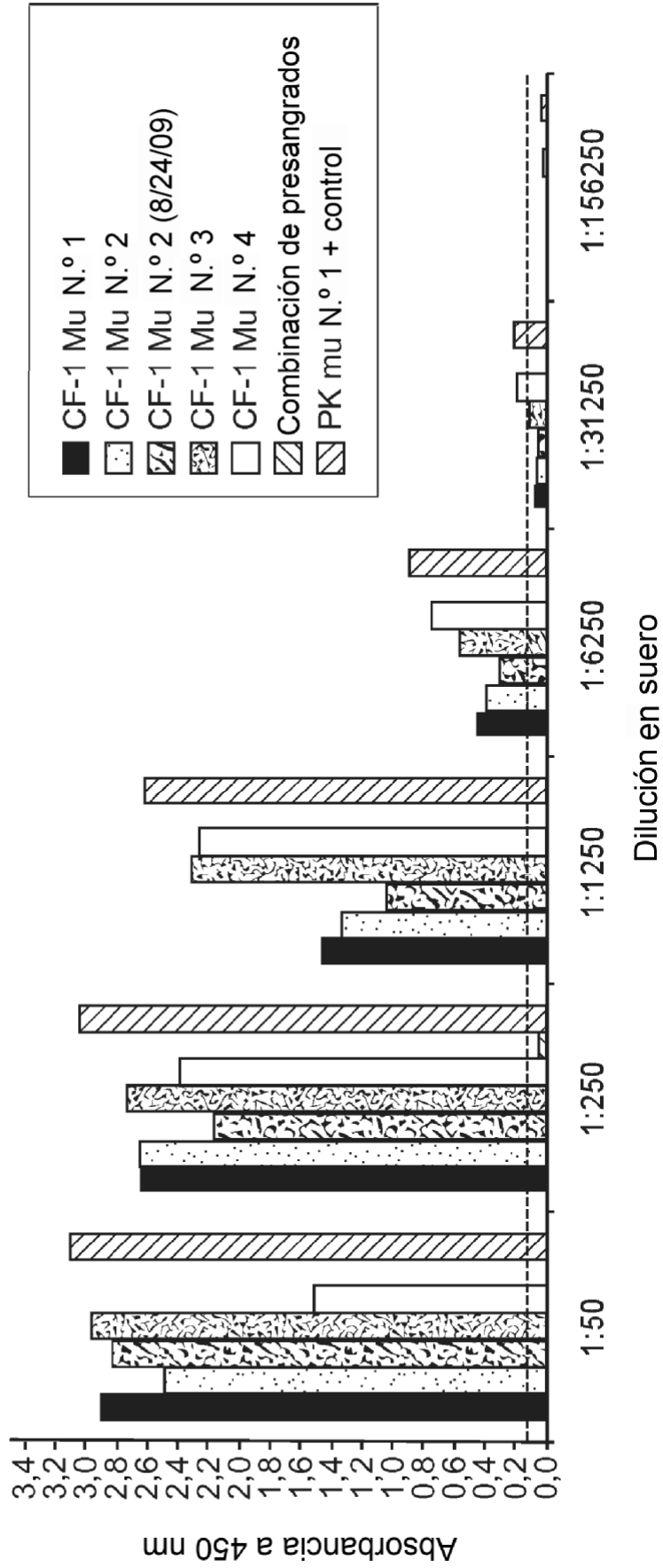


FIG. 7

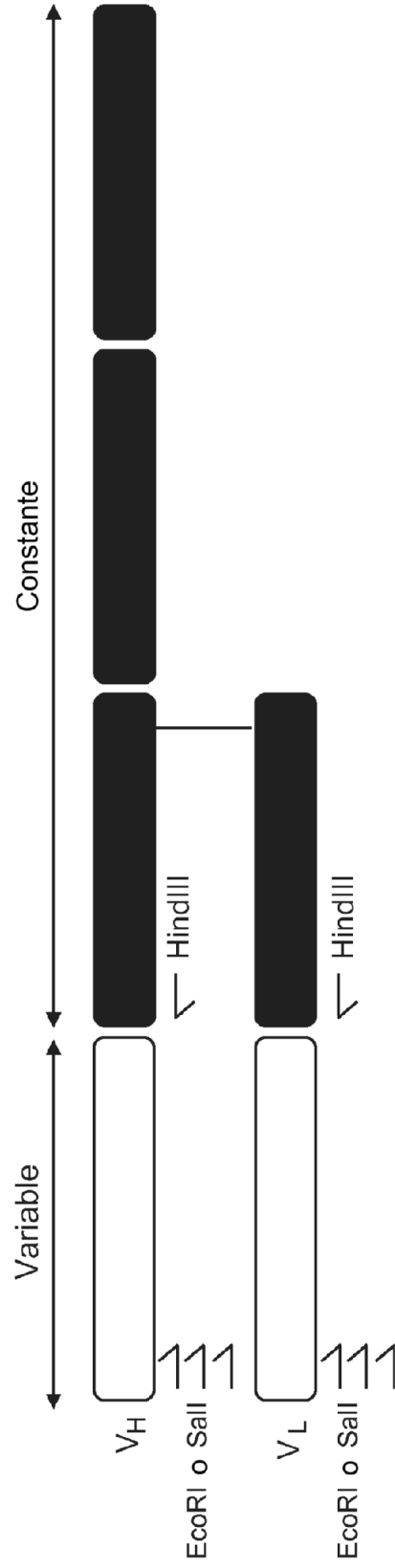


FIG. 8

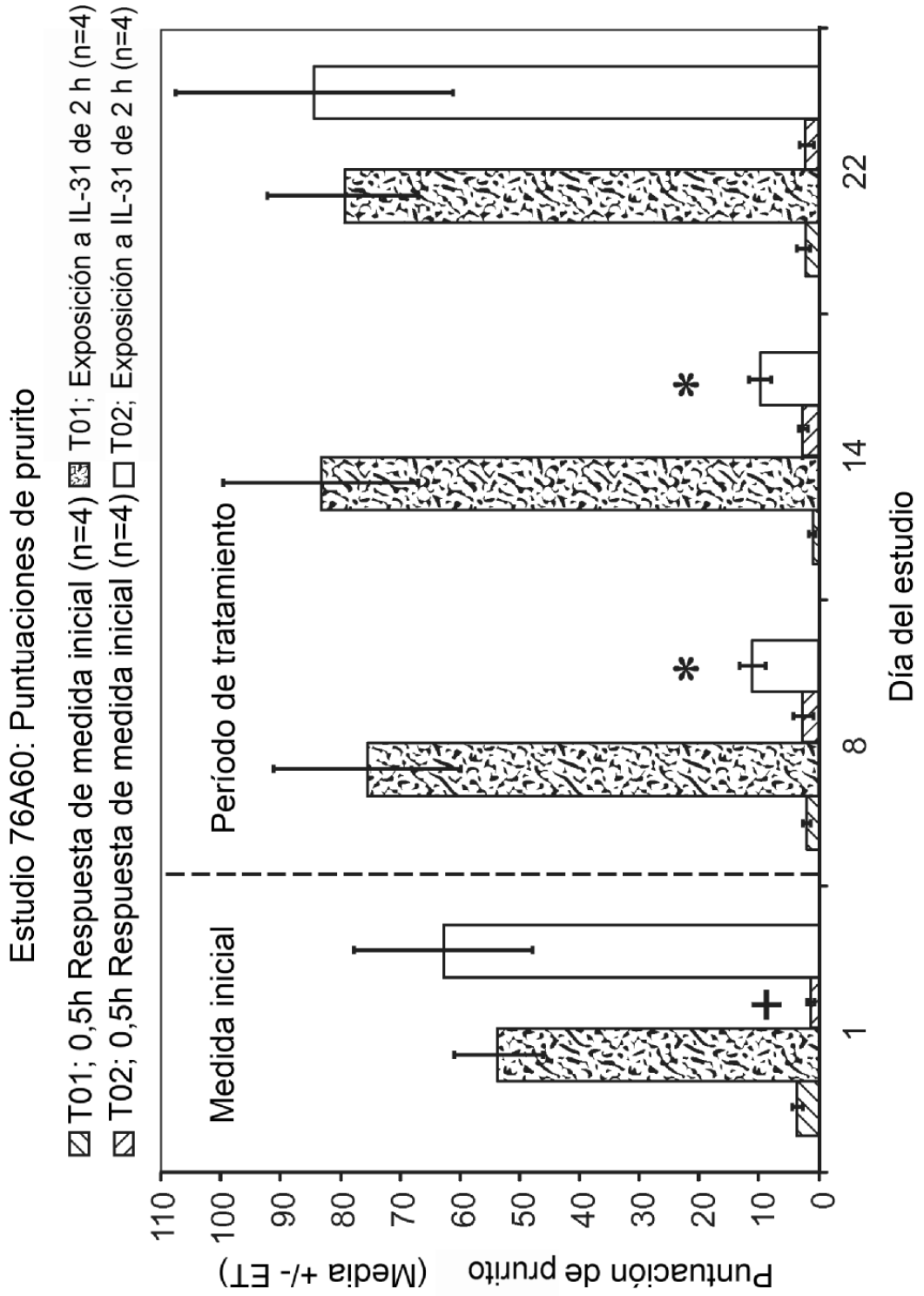


FIG. 9

T01-Placebo a 1X/d, SC en d0 y d7 (n=4)
Comparaciones de la respuesta a la exposición a IL-31 de 2h

Fecha Día del estudio	26-Oct-10			2-Nov-10			8-Nov-10			15-Nov-10		
	30' BL	2h IL-31	1	30' BL	2h IL-31	8	30' BL	2h IL-31	14	30' BL	2h IL-31	22
ID del perro												
4265068	4	58	0	77	0	102	0	82	75,36	32,8	41,4	
4804228	5	71	3	114	2	114	4	112	60,56	60,6	57,7	
4271963	4	37	2	39	0	41	3	52	10,81	5,4	40,5	
4549040	1	48	3	72	2	76	3	72	58,33	50,0	50,0	
Media	3,5	54	2,0	76	1,0	83	2,5	80	51,4	37,2	47,4	
Error típico	0,9	7	0,7	15	0,6	16	0,9	13	14,1	12,0	4,1	

T02-Placebo a 1X/d, SC en d0; Chim 11E12 a 0.3mg/kg, SC en d7 (n=4)
Comparaciones de la respuesta a la exposición a IL-31 de 2h

Fecha Día del estudio	26-Oct-10			2-Nov-10			8-Nov-10			15-Nov-10		
	30' BL	2h IL-31	1	30' BL	2h IL-31	8	30' BL	2h IL-31	14	30' BL	2h IL-31	22
ID del perro												
5427193	0	55	1	11	1	7	1	92	(80,0)	(87,27)	67,3	
5853010	1	32	8	16	4	14	1	17	(50,0)	(56,25)	(46,9)	
5353556	3	61	0	7	2	10	5	120	(88,5)	(83,61)	96,7	
5044073	1	103	2	10	3	8	1	109	(90,3)	(92,23)	5,8	
Media	1,3	63	2,8	11	2,5	10	2,0	85	(77,2)	(79,8)	30,7	
Error típico	0,6	15	1,8	2	0,6	2	1,0	23	9,3	8,1	32,1	

FIG. 10

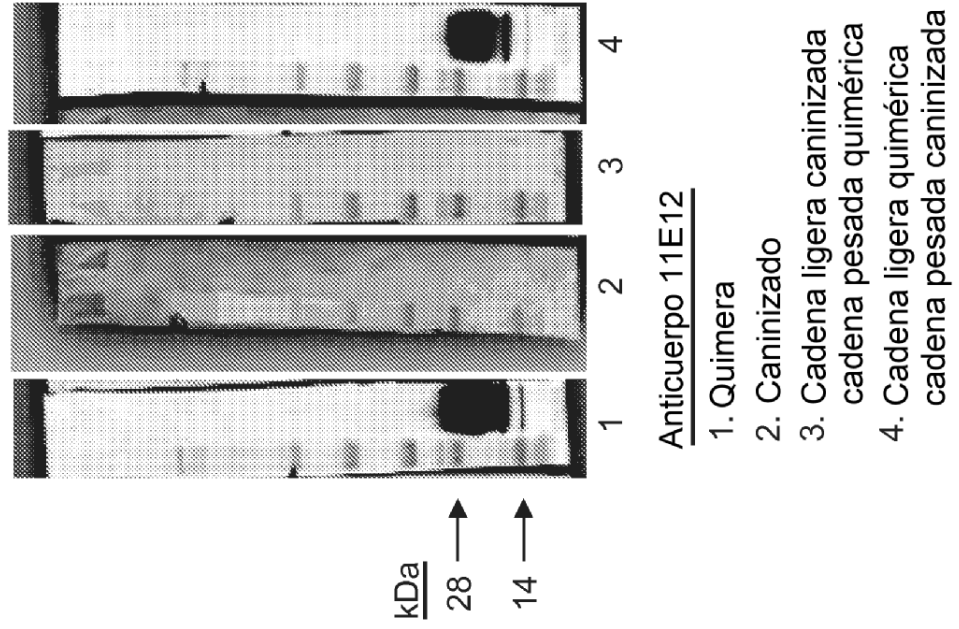


FIG. 12

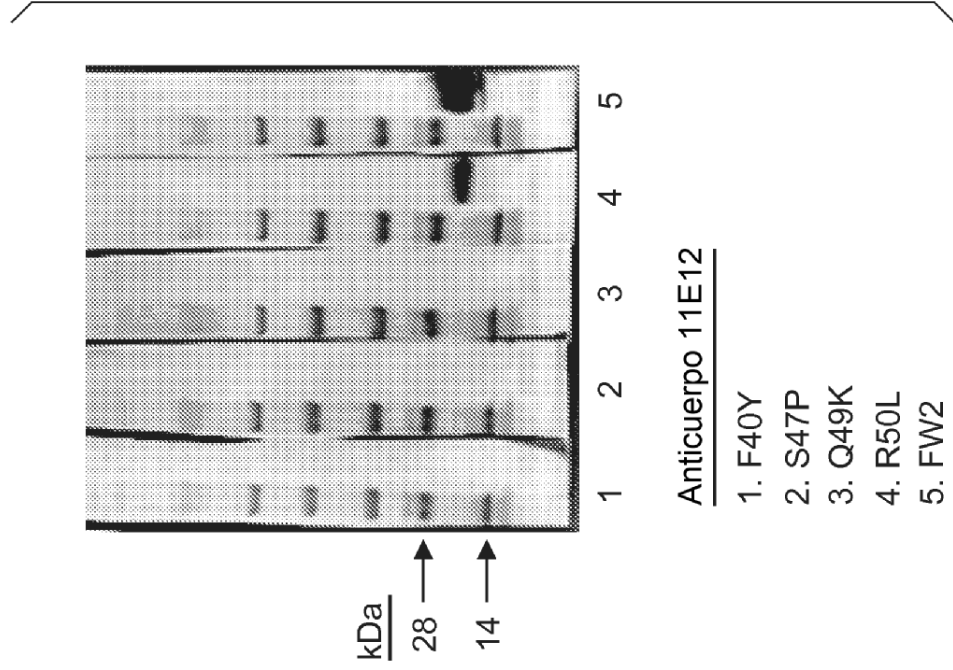


FIG. 11

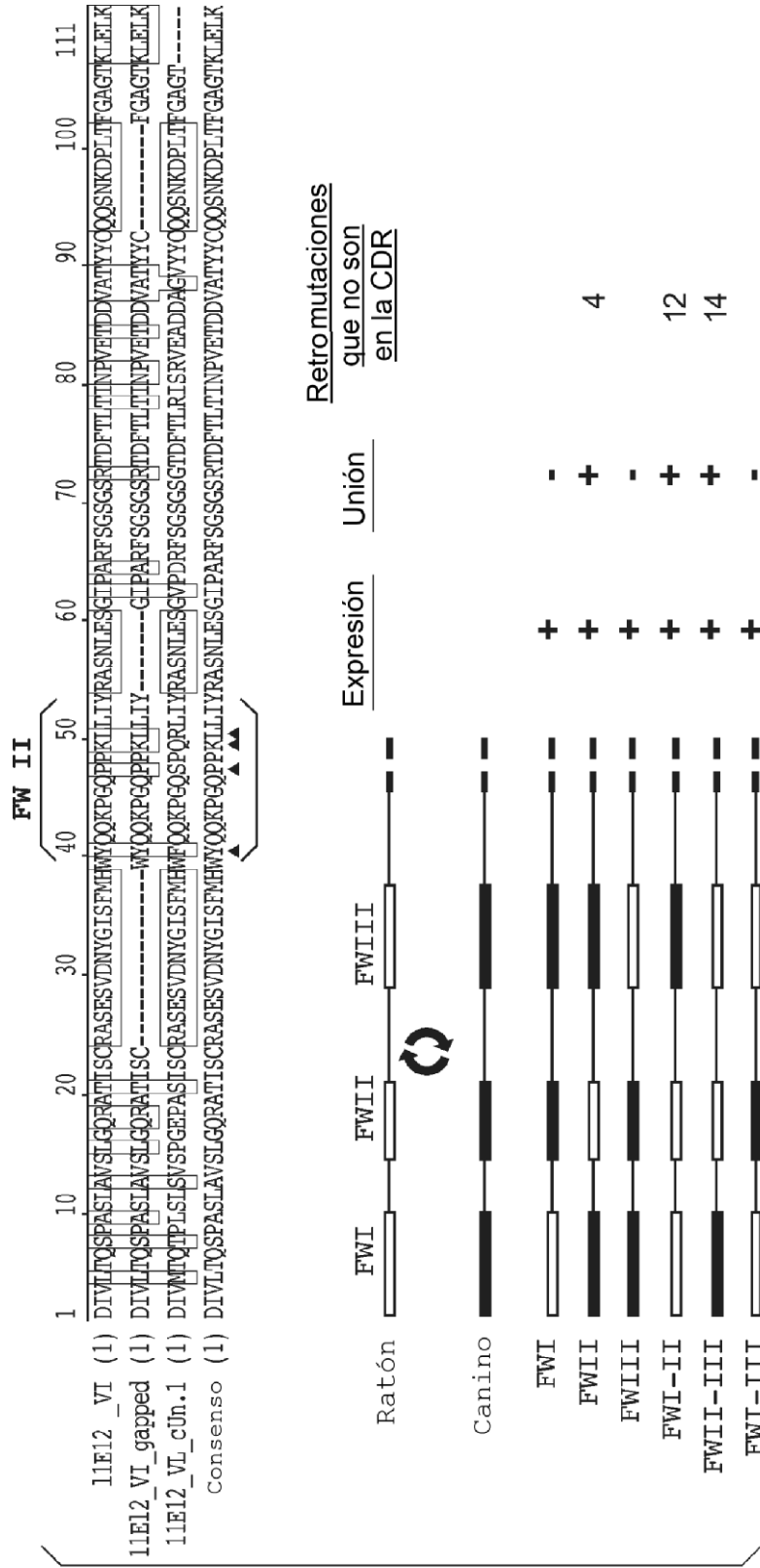


FIG. 13

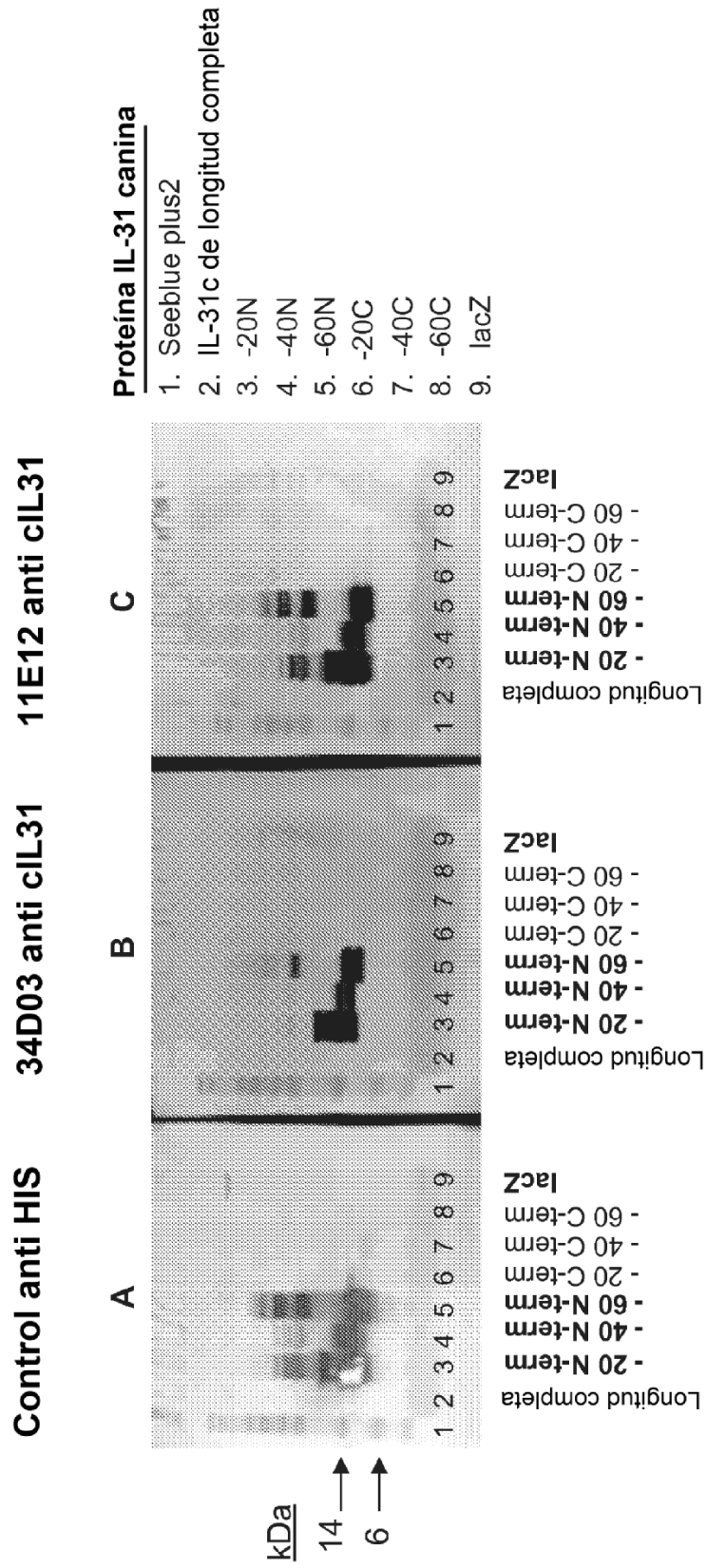


FIG. 14

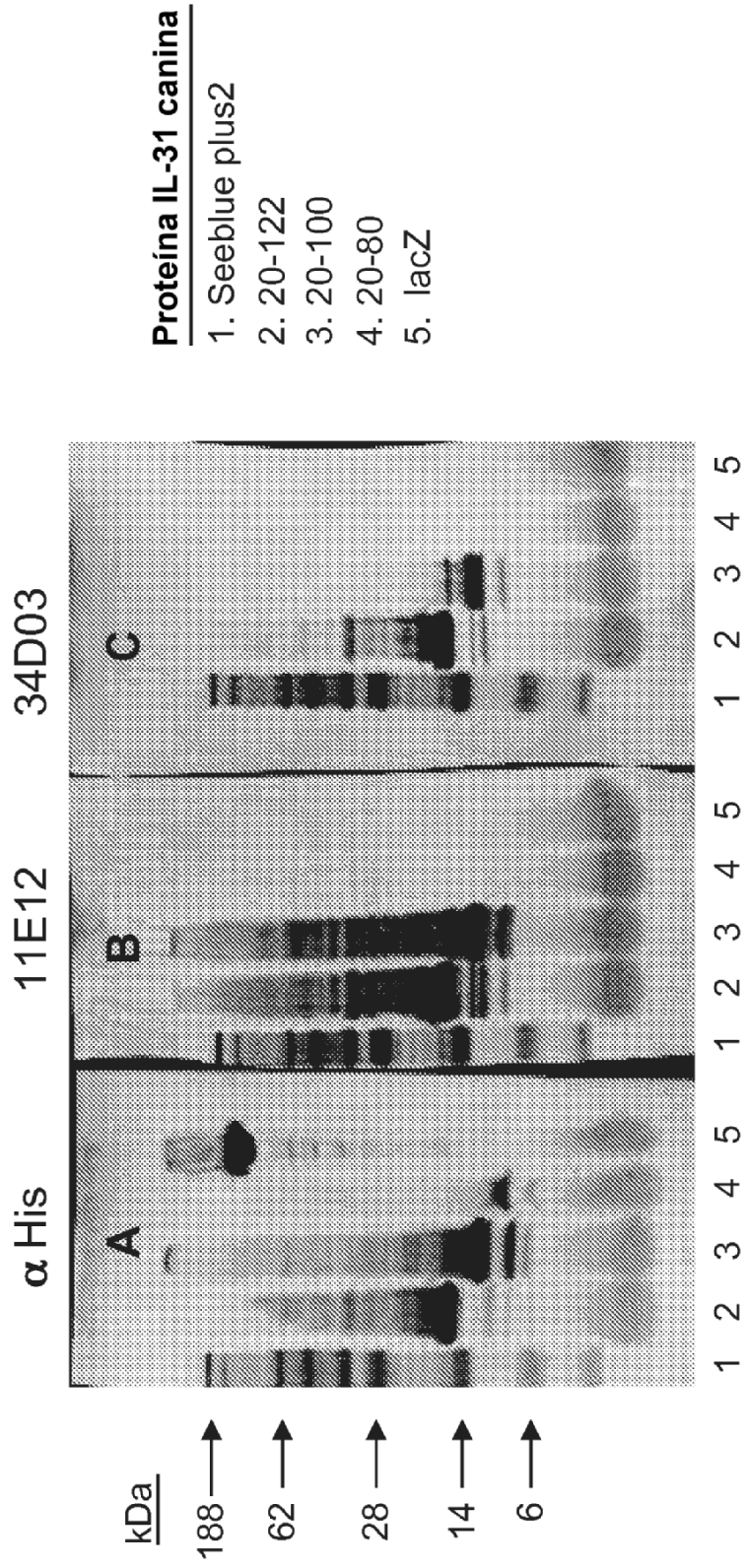


FIG. 15

IL-31 canina con sustitución de alanina

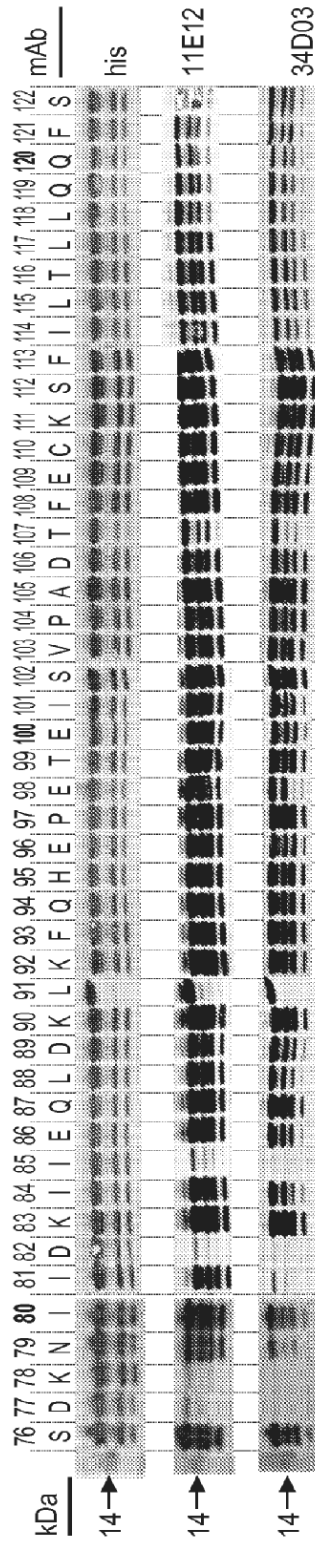


FIG. 16

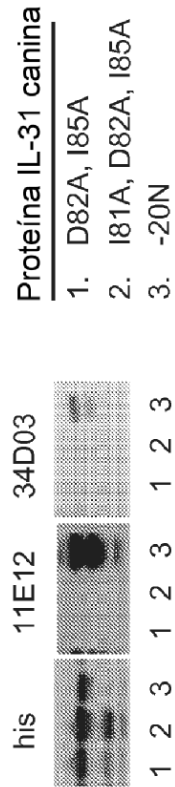


FIG. 17

Estudio 76B00: Puntuaciones de prurito

- Respuesta de medida inicial de 0,5h pre-exposición a IL-31 (n=4)
- ▨ Respuesta de 2h posexposición a IL-31 (n=4)

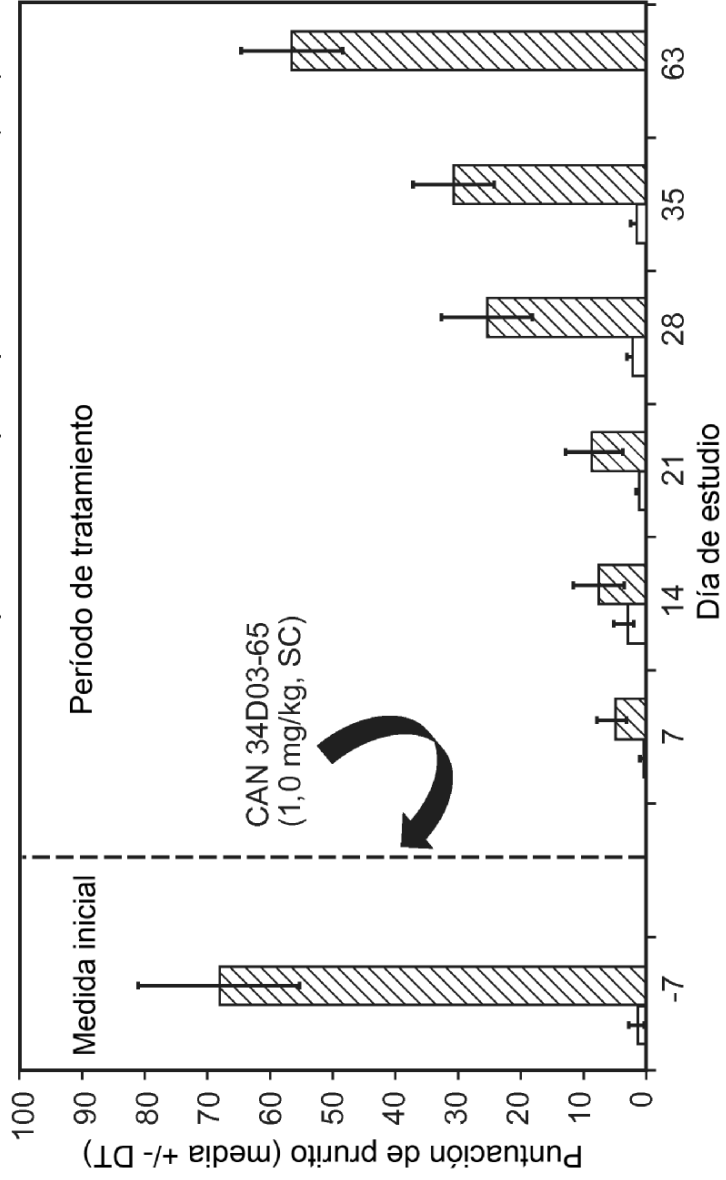


FIG. 18

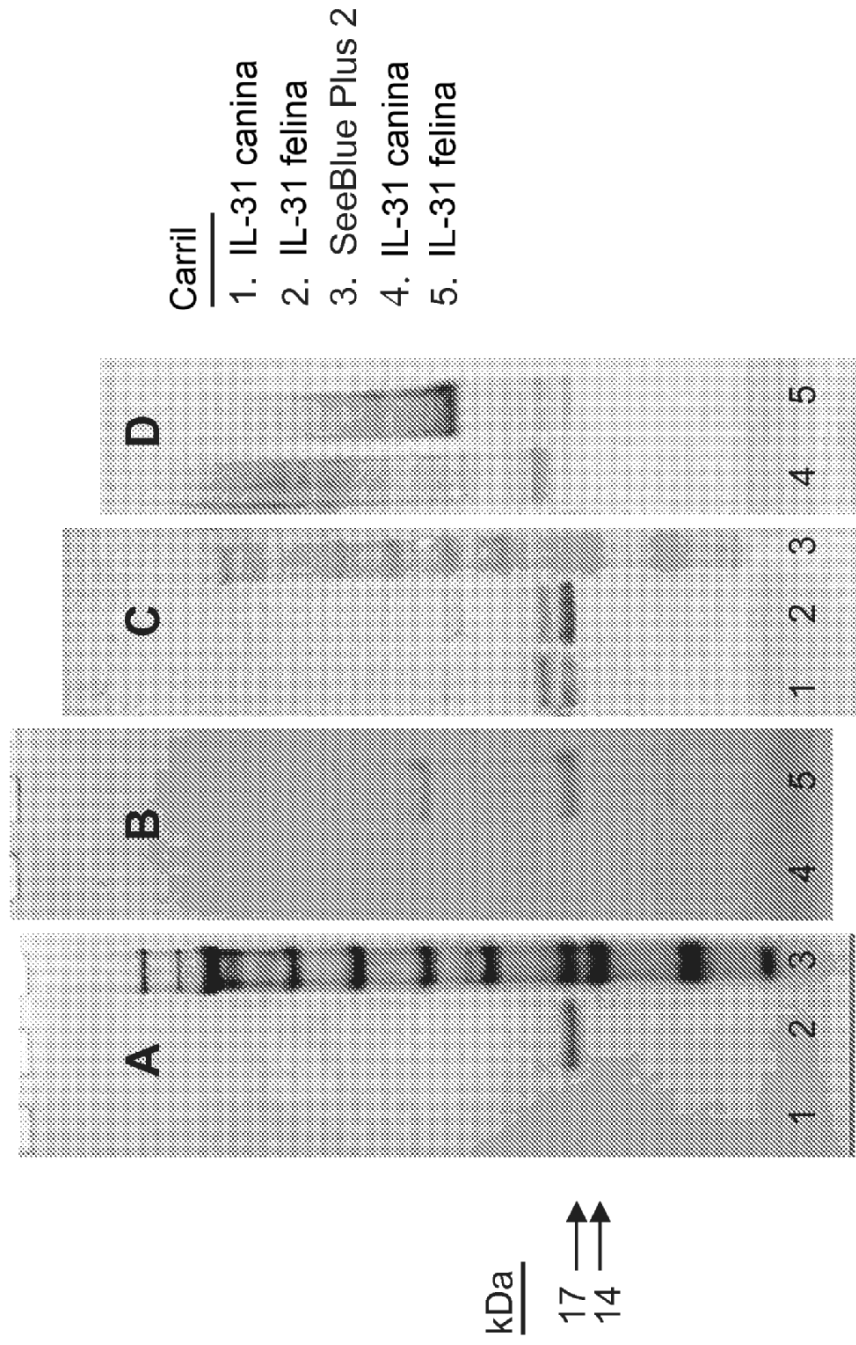


FIG. 19

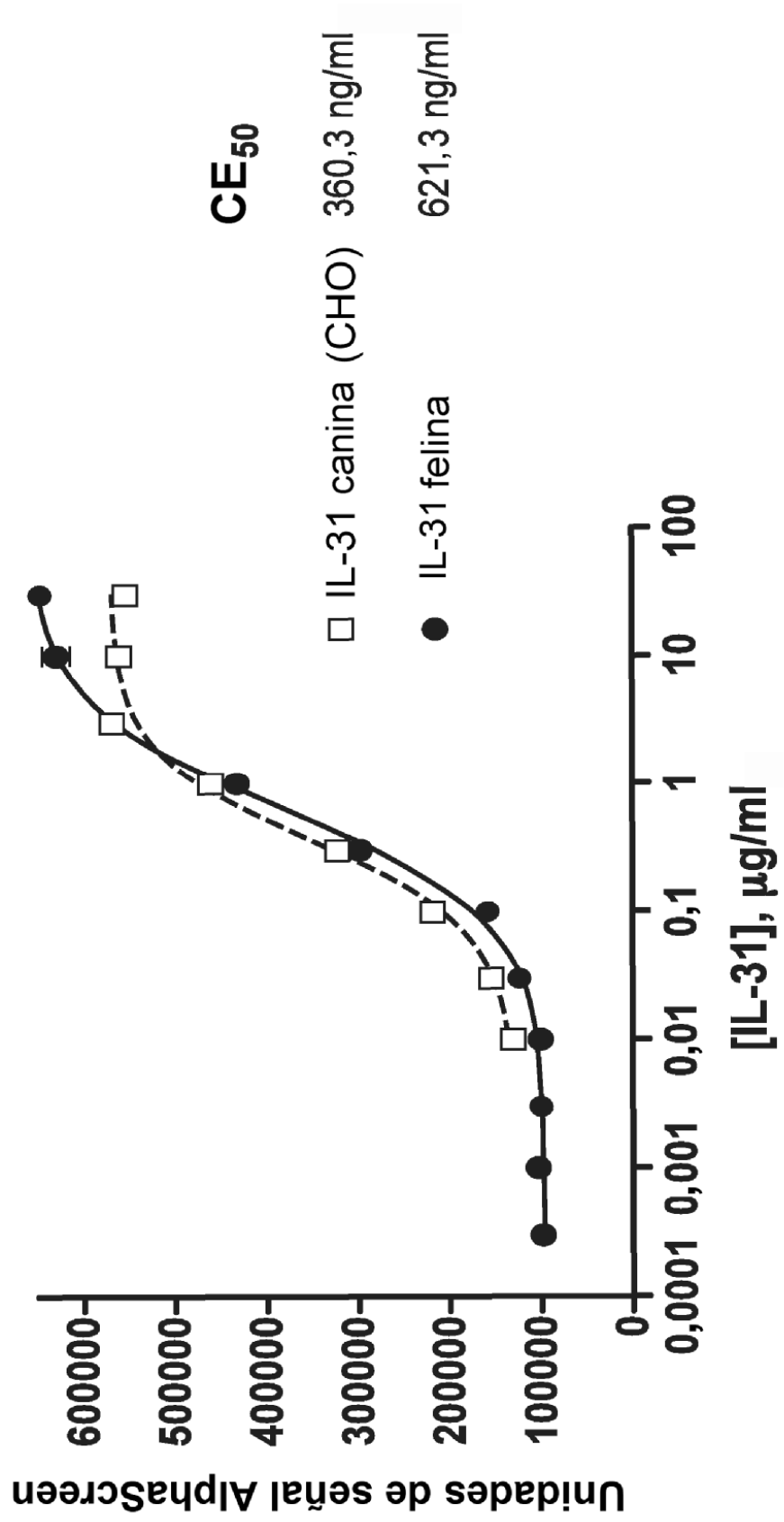


FIG. 20

IL-31 canina	S	D	K	N	I	D	K	I	E	Q	L	D	K	L	90
IL-31 felina	S	D	K <td>N</td> <td>T</td> <td>D</td> <td>K</td> <td>I</td> <td>E</td> <td>Q</td> <td>L</td> <td>D</td> <td>K</td> <td>L</td> <td></td>	N	T	D	K	I	E	Q	L	D	K	L	
	.	+	+	.	.	+	.	+

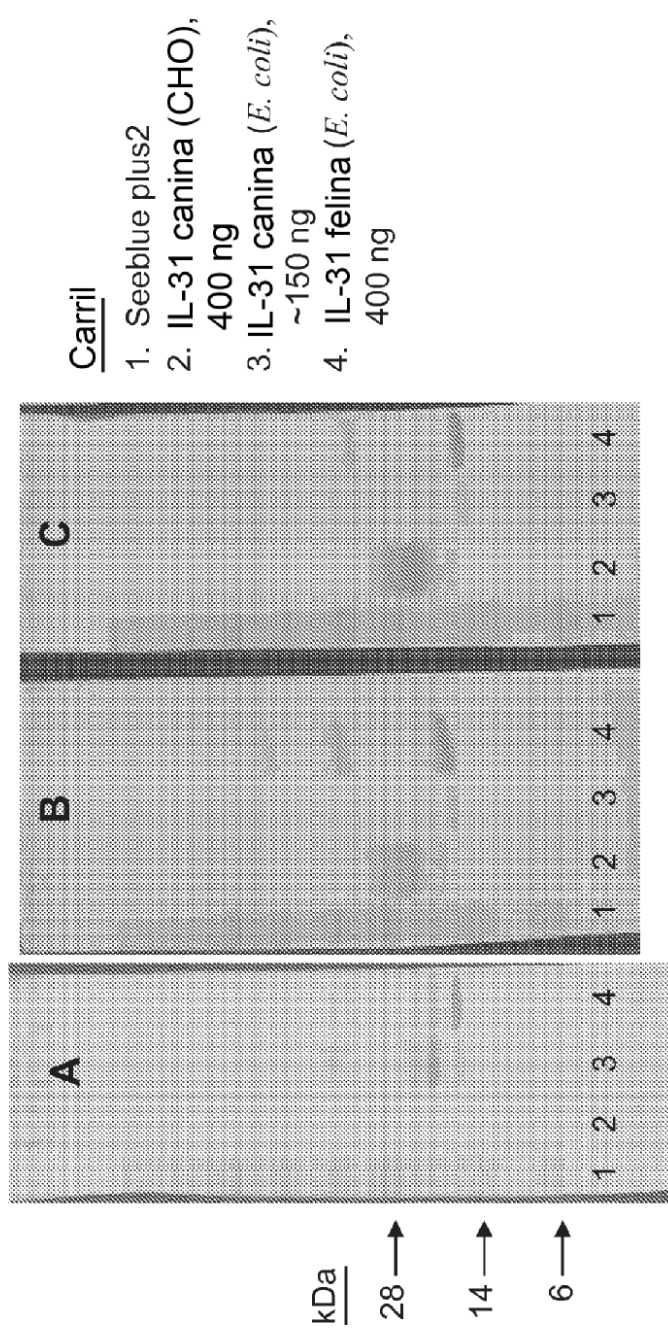


FIG. 22

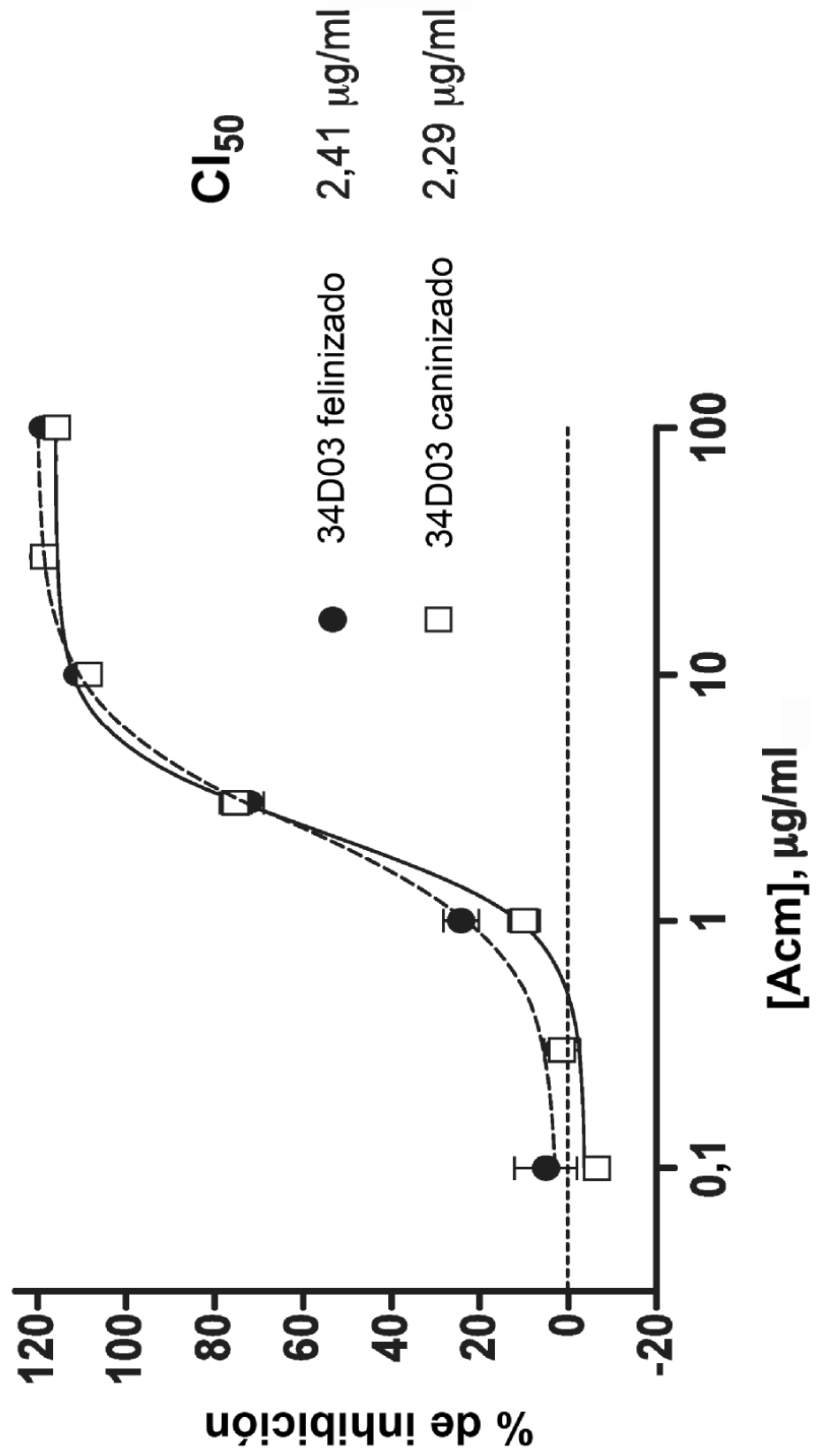


FIG. 23

