

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 723**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2015 PCT/IL2015/050498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015 E 15792833 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3142692**

54 Título: **Composiciones que comprenden IL-31 y usos de esta**

30 Prioridad:

12.05.2014 US 201461991641 P

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

15.01.2020

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LIMITED (100.0%)
Senate House, Technion City
3200004 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**FREMDER, ELLA;
ARONHEIM, AMI y
SHAKED, YUVAL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 737 723 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

Composiciones que comprenden IL-31 y usos de esta

Antecedentes de la invención

5 El cáncer es una de las principales causas de muerte en la mayoría de los países y el resultado de miles de millones de dólares en gastos en atención médica en todo el mundo. Ahora está bien establecido que una variedad de cánceres son causados, al menos en parte, por anomalías genéticas que dan como resultado ya sea la sobreexpresión de genes causantes de cáncer, llamados "oncogenes", o por mutaciones de pérdida de función en genes protectores, a menudo llamados genes "supresores de tumores". Uno de los principales obstáculos en la oncología clínica es que los tumores generalmente pueden resistir la terapia, lo que da lugar a un re-crecimiento del tumor e incluso a la metástasis. Hay muchas razones que pueden explicar por qué las células tumorales se vuelven resistentes a los medicamentos contra el cáncer, como la capacidad de las células para someterse a la selección de la resistencia adquirida.

Se ha demostrado que varios tipos de células derivadas de la médula ósea se dirigen a los tumores tratados con quimioterapia y colonizan allí, lo que da lugar a un aumento de la angiogénesis y la metástasis.

15 La contribución de las células huésped al crecimiento del tumor no depende únicamente de la angiogénesis. Estudios recientes indicaron que las células inmunes, como macrófagos, también referidos como macrófagos asociados a tumor (TAMs) contribuyen al crecimiento del tumor. Los macrófagos son células mieloides que están relacionadas con la inflamación. Hay dos fenotipos principales de macrófagos: M1 y M2. Estos dos fenotipos están asociados no solo con tumores sino también con otras afecciones patológicas y fisiológicas relacionadas con la cascada inflamatoria. Durante el proceso inflamatorio, los macrófagos M1 llegan inicialmente y colonizan el tejido dañado. Secretan varias citoquinas y quimioquinas en el sitio inflamatorio que desatan la cascada inflamatoria. Los macrófagos M1 tienen fuertes propiedades fagocíticas y secretan factores pro inflamatorios. Por otro lado, los macrófagos M2 colonizan el tejido inflamatorio solo unos días después de que los macrófagos M1 colonizaran el tejido. Su función es detener el proceso inflamatorio e iniciar un proceso de regeneración. Por lo tanto, secretan citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento conocidos para reparar el tejido dañado, entre ellos se encuentran factores que promueven la proliferación celular, la migración y la activación. En el cáncer, se encontró que los macrófagos M2 contribuyen sustancialmente al proceso de la tumorigénesis y a la metástasis, mientras que los macrófagos M1 probablemente contribuyen a la inhibición de las propiedades pro-tumorigénicas de las células cancerígenas al crear un proceso inflamatorio agudo.

25 La IL-31 es una citoquina inmunorreguladora que se produce principalmente por las células Th2 activadas. La IL-31 actúa a través de los receptores heterodiméricos de IL-31 (IL-31R) y del receptor de oncostatina M (OSMR), que se expresan en monocitos activados por IL-31 y en células epiteliales.

35 Vazquez-Lomardi et al., 2013 (Antibodies, vol 2(3), p426-451) describe varios métodos ingeniería molecular de citoquinas terapéuticas, que incluyen interleucinas. Esto incluye hacer proteínas de fusión con albúmina o dominios Fc y PEGilación. No se hace referencia a la IL-31. Zhang et al., 2008 (Cytokine and Growth Factor Reviews, vol 19, p347-356) describe el uso de altas cantidades de IL-31 para suprimir la proliferación celular en células HCT116. Jazayeri et al., 2008 (Biod, Adis International vol 22, p11-26) revisan los criterios de diseño para proteínas de fusión que dan lugar a citoquinas basadas en Fc.

El posible papel de la IL-31 como un compuesto anti-cancerígeno no se investigó hasta la fecha. Existe la necesidad de identificar un nuevo tratamiento para el cáncer.

40 Resumen de la invención

La presente invención proporciona IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, o un complejo que comprende ya sea IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, para usar en el tratamiento del cáncer que expresa un receptor de IL-31.

50 En una realización de la invención, el cáncer es cáncer renal, cáncer biliar, cáncer prostático, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero, cáncer de testículo, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de piel.

En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica, como mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) o leucemia mieloide crónica (LMC).

La presente invención también proporciona IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, o un complejo que comprende ya sea IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con la angiogénesis.

En una realización de la invención, el trastorno relacionado con la angiogénesis es cáncer, artritis, artritis reumatoide, placas ateroscleróticas, neovascularización del injerto de córnea, cicatrices hipertróficas o queloides, retinopatía proliferativa, retinopatía diabética, degeneración macular o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), granulación, glaucoma neovascular o uveítis. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la angiogénesis es "enfermedades relacionadas con la fibrosis", p. ej., fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la angiogénesis es asma, Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF), Mielofibrosis o Colangitis Esclerosante Primaria.

Breve descripción de los dibujos

El tema considerado como la invención particularmente se señala y se reivindica claramente en la parte final de la memoria descriptiva. La invención, sin embargo, tanto en cuanto a la organización como al método de operación, junto con los objetivos, características y ventajas de esta, se puede entender mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada cuando se interpreta con los dibujos adjuntos en los que:

Figs. 1(A-E): La imagen superior de la Fig. 1A es una imagen de western blot que muestra el nivel de expresión de IL-31 en varias líneas de células tumorales y macrófagos. Debajo hay una imagen de western blot que muestra el nivel del receptor de IL-31 (IL-31R) en varias líneas de células tumorales y macrófagos. Una estrella (*) representa las células metastásicas. Un tipo de célula subrayado representa una célula no metastásica, otras líneas celulares son líneas celulares hematológicas. Se puede observar una correlación inversa entre la expresión de IL-31 y su receptor y las propiedades metastásicas de las células tumorales. Las Figs. 1B, 1C, 1D y 1E presentan la viabilidad de células MC38 (Fig. 1B), células 4T1 (Fig. 1C), células CT26 (Fig. 1D) y células HCT116 (Fig. 1E), respectivamente, en presencia de dosis crecientes de IL-31 recombinante (rIL-31) usando el ensayo Alamar-Blue; las Figs. 1D y 1E presentan el número de células de MC38 (Fig. 1D) y 4T1 (Fig. 1E) en presencia de diferentes dosis de rIL-31 usando azul tripán para excluir las células muertas;

Figs. 2 (A y B): La Fig. 2A es una imagen de Western Blot que compara la expresión de IL-31 en lisados de MC38 transfectadas con plásmido shIL-31 o con plásmido aleatorizada; la Fig. 2B es un gráfico que muestra el porcentaje de reducción de la expresión de IL-31 en células MC38 transfectadas con plásmido shIL-31 o con plásmido aleatorizado, como se evaluó mediante densitometría;

Figs. 3 (A-C): la Fig. 3A compara el tamaño del tumor (mm^3) en ratones que se inyectaron subcutáneamente en los costados con células MC38 transfectadas ya sea con plásmido shIL31 o aleatorizado; la Fig. 3B presenta la densidad de microvasos (MVD) y de estructuras de grandes vasos en el tumor extraído de ratones inyectados con células MC38 transfectadas con plásmidos shIL-31 o aleatorizado; se contaron y se representaron gráficamente el número de estructuras de vasos o de células por campo. Las Figs. 3C y 3D presentan el número de macrófagos (células F4/80+) (Fig. 3C) y de células endoteliales (Fig. 3D) en el tumor extraído de ratones inyectados con células MC38 transfectadas con plásmidos shIL-31 o aleatorizado;

Figs. 4 (A-I): la Fig. 4A muestra el tamaño del tumor (mm^3) en ratones implantados con células MC38 en el costado e implantados con minibomba que contiene ya sea rIL-31 o PBS (control); la Fig. 4B muestra el tamaño del tumor (mm^3) en ratones implantados con células 4T1 en la almohadilla de grasa mamaria e infundidos con minibomba que contiene ya sea rIL-31 o PBS (control); la Fig. 4C compara la densidad de microvasos (MVD) en tumores que se extrajeron de los ratones implantados con MC38 e infundidos con rIL-31 o PBS (control). Los tumores se extrajeron, seccionaron y se tiñeron inmunológicamente con CD31; la tinción nuclear se delimitó por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); la Fig. 4D es un gráfico que compara los niveles de MVD en tumores de ratones implantados con MC38 e infundidos con 0,7 $\mu\text{g}/\text{día}$ de rIL-31 o PBS (control). Las Figs. 4E y 4F comparan el número de lesiones metastásicas pulmonares usando la tinción H&E de secciones pulmonares en tumores de ratones implantados con células 4T1 e infundidos con rIL-31 o PBS (control) (Fig. 4E); las flechas representan las lesiones metastásicas en la sección pulmonar. Se proporciona la cuantificación del número de lesiones metastásicas por campo (Fig. 4F). La Fig. 4G muestra el crecimiento del tumor (mm^3) en ratones NOD-SCID que fueron implantados con células HCT116 (2×10^6 células; $n=5$ ratones/grupo). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 50 mm^3 , se implantaron los ratones con bombas que contenían $150 \mu\text{g}$ de proteína hIL31-IgG o se inyectaron intraperitonealmente dos veces a la semana con $50 \mu\text{g}$ de hIL-31-IgG. Se evaluó el crecimiento del tumor con el tiempo.

Figs. 4H y 4I, los tumores presentados en la Fig. 4G se extrajeron en el punto final después de que los ratones se trataran con hIL-31-IgG durante dos semanas ya sea mediante bomba o mediante inyecciones IP. (4H) los tumores se seccionaron y tiñeron para CD31 (un marcador de célula endotelial). (4I) Se proporciona la cuantificación del número de vasos (MDV) por campo.

Figs. 5 (A-C): la Fig. 5A es un gráfico que compara el número de macrófagos de fenotipo M1 y macrófagos de fenotipo M2 en células J774 cultivadas en presencia y ausencia de rIL-31 (100 ng); las células se tiñeron inmunológicamente con F4/80, CD206 y CD11c para evaluar el porcentaje de macrófagos M1 (CD11c+/CD206-) y M2 (CD11c-/CD206+).

5 La Fig. 5B es un gráfico que compara el número de macrófagos de fenotipo M1 y macrófagos de fenotipo M2 en una única suspensión celular de tumores MC38 implantados en C57B16 que, ya expresen IL-31 (ev-aleatorizado) o no (shIL-31), y se dejaron crecer hasta el punto final. Se analizó el porcentaje de macrófagos M1 y M2 que colonizan los tumores usando citometría de flujo. La Fig. 5C es un gráfico que compara el número de macrófagos de fenotipo M1 y macrófagos de fenotipo M2 en una única suspensión celular de tumores MC38 que se implantaron en los costados de ratones C57B1/6. Cuando los tumores alcanzaron 150-200 mm³, se les implantaron a los ratones minibombas que
10 contenían PBS (control) o IL-31 recombinante en una dosis de 0,7 µg/día (rIL-31). Se analizó el porcentaje de macrófagos M1 y M2 que colonizan tumores usando citometría de flujo.

La Fig. 6 representa una evaluación de la viabilidad celular MC38 usando el ensayo Alamar Blue. Las células se cultivaron en presencia de dosis crecientes de mL-31-IgG. Se observó una reducción en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de IL-31-IgG.

15 La Fig. 7 muestra un ejemplo de imagen de tinción para la biopsia de cáncer de mama P-12855/11. Se observa alta intensidad de expresión de IL-31R en células de carcinoma de la biopsia de cáncer de mama.

Figs. 8 (A-I): muestra que la IL-31-IgG se estabiliza durante al menos 72 horas en sangre periférica. Se transfectaron células 293T con el constructo IL-31-IgG. (8A). El medio condicionado (CM) y los lisados se obtuvieron después de 48 horas y luego se detectaron para los varios componentes del constructo de IL-31 mediante Western Blot. (8B-E).
20 Detección de la parte mL-31 (8B), la parte mCH2-CH3-IgG (8C), la parte Myc (8D) y la parte His (8E) usando los anticuerpos Cabra-a-Rata, G-a-m-IgG, G-a-m-ligera, G-a-m-ligera, respectivamente. La tinción de Azul Brillante de Coomassie (CBB) de 20 mg de hIL-31-IgG y mL-31-IgG purificados se muestra en 8F. (8G-H) Se ha probado la proteína IL-31-IgG (tanto humana como de ratón) que se generó y purificó para determinar su estabilidad en sangre periférica de ratones. Se inyectaron ratones C57B16 con 30 µg de las proteínas IL-31 indicadas. Se extrajo la sangre por el seno retro-orbital a diferentes puntos temporales y se separó el plasma. Se usó plasma (2 µl) para detectar las
25 diversas proteínas de IL-31 usando el anticuerpo conjugado anti-His-HRP por Western Blot. (8G) 30 µg de mL31-IgG frente a 200 µg de mL31. (8H) 30 µg de hIL31-IgG frente a 200 µg de hIL31.

Figs. 9 (A y B): se sembraron células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVECs) en placas de cultivo de tejido de 48 pocillos recubiertas con Matrigel (4 x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron en medio M-199 con FBS al 20%.
30 Los pocillos se cultivaron con 100 ng/ml de IL-31 recombinante humana o con 10 µg/ml de IL-31-IgG humana. Las células se cultivaron y se tomaron imágenes de contraste de fase de los tubos de microvasos después de 200 minutos a 100 aumentos usando el Leica CTR 6000 (Leica Microsystems). Las imágenes se analizaron usando el paquete informático ImageJ y se cuantificaron contando el número de uniones HUVEC (bifurcaciones) por campo. La Figura 9A muestra imágenes representativas de formación de tubos de HUVECs en presencia de 100 ng/ml de IL-31
35 recombinante humana (rhIL31) o 10 µg/ml de IL-31-IgG que se proporcionan en un punto de tiempo de 200 minutos. Se cuantificaron y presentaron el número de bifurcaciones por campo. *, p<0,05; ***, p<0,001 como se muestra en la Figura 9B.

Descripción detallada de la invención

40 En la siguiente descripción detallada, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, los expertos en la materia entenderán que la presente invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito en detalle métodos bien conocidos, procedimientos y componentes para no eclipsar la presente invención.

45 Como se muestra en la sección de Ejemplos, se encontró que la IL-31 es altamente eficaz para inhibir la proliferación de células tumorales, el tamaño del tumor y la metástasis en células y tumores. Por lo tanto, se describe que el beneficio de la IL-31 en el tratamiento de tumores puede depender de la presencia de la expresión de IL-31 o IL-31R en el tumor. También se describe, como se ejemplifica en los Ejemplos 2 y 4, que la IL-31 puede tener un efecto indirecto sobre cualquier célula tumoral, por ejemplo, a través de un efecto sobre las células de apoyo en el microambiente tumoral, es decir, células endoteliales y macrófagos. Por lo tanto, se describe un método para tratar el
50 cáncer que comprende la etapa de administrar IL-31, una proteína de fusión que comprende IL-31, o un complejo que comprende ya sea IL-31 o una proteína de fusión que comprende IL-31 a un sujeto que lo necesita, por lo tanto, tratar el cáncer.

La presente invención proporciona IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, un agonista del receptor de IL-31 o un complejo que comprende ya sea IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 para usar en el tratamiento del cáncer que expresa un receptor de IL-31.

También se describe un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de poner en contacto las células cancerosas del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-31, una proteína de fusión que comprende IL-31, o un complejo que comprende ya sea IL-31 o una proteína de fusión que comprende IL-31, por lo tanto, tratando el cáncer.

- 5 También se describe un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de poner en contacto células cancerosas del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de regular al alza la IL-31 o un agente que es agonista de los receptores de IL-31, por lo tanto, tratando el cáncer.

De acuerdo con algunas realizaciones, el contacto se efectúa in vivo. De acuerdo con algunas realizaciones, el contacto se efectúa ex vivo.

- 10 Se describe que el cáncer a tratar puede ser un cáncer oral, cáncer de orofaringe, cáncer nasofaríngeo, cáncer respiratorio, un cáncer urogenital, un cáncer gastrointestinal, un cáncer del tejido nervioso central o periférico, un cáncer endocrino o neuroendocrino o un cáncer hematopoyético.

También se describe que el cáncer a tratar puede ser un glioma, un sarcoma, un carcinoma, un linfoma, un melanoma, un fibroma o un meningioma.

- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cáncer a tratar es cáncer renal, cáncer biliar, cáncer prostático, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de piel.

- 20 En algunas realizaciones de la invención, el cáncer a tratar es un cáncer de mama, un cáncer de páncreas o un cáncer de pulmón.

En algunas realizaciones de la invención, el cáncer a tratar es un tumor hematológico maligno seleccionado de mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC).

- 25 También se describe un método para prevenir o reducir la metástasis que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-31, una proteína de fusión que comprende IL-31, un agente que regula al alza IL-31 o un agente que es un agonista del receptor de IL-31 o un complejo que comprende ya sea IL-31 o una proteína de fusión que comprende IL-31, a un sujeto que lo necesita previniendo, por lo tanto, la metástasis.

- 30 Como se usa en esta memoria, el término “tratar el cáncer” se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar o suprimir el cáncer, así como dar como resultado uno o más de los siguientes parámetros: reducción en el tamaño o la carga del tumor, bloqueo del crecimiento del tumor, cambio del fenotipo del macrófago de M2 a M1, reducción del dolor asociado con el tumor, no progresión a largo plazo, inducción de remisión, reducción de la metástasis o aumento de la supervivencia del paciente.

- 35 Como se usa en esta memoria, el término “cáncer” se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células que causan cáncer, por ejemplo, proliferación incontrolada, pérdida de funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastático significativo, aumento significativo en la actividad antiapoptótica, crecimiento y velocidad de proliferación rápidos y ciertos marcadores morfológicos y celulares característicos. Típicamente, las células cancerígenas están en forma de un tumor, que existe localmente dentro de un animal o circulando en el torrente sanguíneo como células independientes, por ejemplo, células leucémicas.

- 40 El tratamiento puede comprender además administrar una segunda terapia contra el cáncer o una tercera terapia contra el cáncer al sujeto tratado. La segunda y la tercera terapias contra el cáncer pueden ser una o dos o más de quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia con citoquinas, inmunoterapia, terapia dirigida, p. ej., bortezomib, sunitinib, Herceptin, sorafenib y/o cirugía. La segunda y tercera terapias contra el cáncer se pueden administrar al sujeto antes o después del tratamiento con IL-31 o al mismo tiempo que el tratamiento con IL-31. Como se usa en esta memoria, el tratamiento con IL-31 incluye tratamientos que usan IL-31, una proteína de fusión que comprende el mismo, agonista del receptor de IL-31 o un agente que regula al alza la IL-31 o un complejo que comprende IL-31 o una proteína de fusión de esta.

- 45 El tratamiento puede además comprender evaluar la eficacia del tratamiento realizando una exploración PET en dicho sujeto o midiendo el nivel de los marcadores biológicos relevantes.

- 50 La presente invención también proporciona IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, un agonista del receptor de IL-31 o un complejo que comprende ya sea IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con la angiogénesis.

Como se usa en esta memoria, el término “tratar los trastornos relacionados con la angiogénesis” se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar o suprimir los trastornos relacionados con la angiogénesis, así como dar como resultado una disminución de la angiogénesis anormal o patológica o aumentar la eficacia de la angiogénesis funcional inhibiendo la permeabilización y, por tanto, aumentar la supervivencia del paciente o reducir los síntomas. El tratamiento puede comprender además administrar una terapia adicional antes o después del tratamiento con IL-31 o al mismo tiempo que el tratamiento con IL-31 al sujeto tratado, como, terapia hormonal, otra terapia anti-angiogénesis, inmunoterapia o una terapia dirigida a la enfermedad relacionada con la angiogénesis anormal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trastorno relacionado con la angiogénesis es cáncer, artritis, artritis reumatoide, placas ateroscleróticas, neovascularización del injerto de córnea, cicatrices hipertróficas o queloides, retinopatía proliferativa, retinopatía diabética, degeneración macular o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), granulación, glaucoma neovascular o uveítis. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la angiogénesis es “enfermedades relacionadas con la fibrosis”, p. ej., fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la angiogénesis es Asma. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la angiogénesis es Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF), Mielofibrosis o Colangitis Esclerosante Primaria.

Se describe que las enfermedades relacionadas con la angiogénesis que se pueden tratar con tratamiento incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias, autoinmunes e infecciosas; cáncer dependiente de la angiogénesis que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores transmitidos por la sangre como leucemias y metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piogénicos; psoriasis; eczema; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo del injerto de córnea, fibroplasia retrolental, rubeosis; Síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de la placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma y granulación de heridas.

Además, también se describe que las composiciones que comprenden el ingrediente activo como se define en esta memoria se pueden usar para tratar enfermedades como, pero no se limitan a, adhesiones intestinales, aterosclerosis, esclerodermia, verrugas y cicatrices hipertróficas (es decir, queloides). Las composiciones de esta invención pueden ser útiles también en el tratamiento de enfermedades que tienen angiogénesis como una consecuencia patológica, como la enfermedad por arañazo de gato (Rochele minalia quintosa), úlceras (*Helicobacter pylori*), tuberculosis y lepra. También se describe que las composiciones se pueden usar para tratar la inflamación o trastornos relacionados con la inflamación.

Por ejemplo, la IL-31 humana (SEQ ID N°. 1 a continuación) (Gene ID: 386653) está codificada por la siguiente secuencia de ácido nucleico:

```

ATGGCCTCTCACTCAGGCCCTCGACGTCTGTGCTCTTTCTGTTCTGCTGCCTGGGA
GGCTGGCTGGCTCCACACGTTGCCCGTCCGTTTACTACGACCAAGTGATGATGT
ACAGAAAATAGTCGAGGAATTACAGTCCCTCTCGAAGATGCTTTTGAAGATGTGG

AGGAAGAGAAGGGCGTGCTCGTGTCCCAGAATTACACGCTGCCGTGTCTCAGCCCT
GACGCCAGCCGCCAAACAACATCCACAGCCCAGCCATCCGGGCATATCTCAAGA
CAATCAGACAGCTAGACAACAATCTGTTATTGATGAGATCATAGAGCACCTCGAC
AAACTCATATTTCAAGATGCACCAGAAACAACATTTCTGTGCCAACAGACACCCA
TGAATGTAAACGCTTCATCCTGACTATTTCTCAACAGTTTTTCAGAGTGCATGGACCT
CGCACTAAAATCATTGACCTCTGGAGCCCAACAGGCCACCACTTAA (SEQ ID NO: 2).

```

35 Secuencia de aminoácidos de la IL-31 humana:

```

MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKDVEEE
KGVLVSNQYTLPLCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIIEHLDKLIQDAP
ETNISVPTDTHECKRFILTISSQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT (SEQ ID N°. 1) (1-23: Péptido señal; 24-164: IL-31)

```

40 Por ejemplo, la IL-31 de ratón (*Mus musculus*) (SEQ ID N°. 6 a continuación) (Gene ID: 76399) está codificada por la siguiente secuencia de ácido nucleico:

ATGATCTTCCACACAGGAACAACGAAGCCTACCCTGGTGCTGCTTTGCTGTATAGG
AACCTGGCTGGCCACCTGCAGCTTGTCTTCGGTGCCCAATATCGAAGGAAGACT
TAAGAACTACAATTGACCTCTTGAAACAAGAGTCTCAGGATCTTTATAACA ACTAT
AGCATAAAGCAGGCATCTGGGATGTCAGCAGACGAATCAATACAGCTGCCGTGTTT
CAGCCTGGACCGGGAAGCATTAAACCAACATCTCGGTCATCATAGCACATCTGGAGA
AAGTCAAAGTGTTGAGCGAGAACACAGTAGATACTTCTTGGGTGATAAGATGGCT
AACAAACATCAGCTGTTTCAACCCACTGAATTTAAACATTTCTGTGCCTGGAAATA
CTGATGAATCCTATGATTGTAAAGTGTTTCGTGCTTACGGTTTTAAAGCAGTTCTCAA
ACTGCATGGCAGAACTGCAGGCTAAGGACAATACTACATGCTGA (SEQ ID NO: 3).

Secuencia de aminoácidos de la IL-31 de ratón:

MIFHTGTTKPTLVLLCCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQESQDLYNNYSIKQ
ASGMSADESIQLPCFSLDREALTNISVIAHLEKVKVLSSENTVDTSWVIRWLTNISC FNPL
5 NLNISVPGNTDESVDCKVFLVTLKQFSNCMAELQAKDNTTC (SEQ ID N° 6) (1-23: Péptido señal; 24-163: IL-31)

Específicamente, la IL-31 SEQ ID N° 1 (Gene ID. N° 386653 (para seres humanos), Gene ID. N° 76399 (para *Mus musculus*), Gene ID. N° 744097 (para *Pan troglodytes* (chimpancé)), Gene ID. N° 102179123 (para *Capra hircus* (cabra)), para usar en la invención también se refiere a homólogos (p. ej., polipéptidos), que son al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 87%, al menos aproximadamente un 89%, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 93%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 97% o más, homólogos a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N° 1 enumerada en esta memoria, según se determine usando cualquier método apropiado, que incluye paquete informático BlastP del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) usando parámetros por defecto. El homólogo se puede referir también a una variante de supresión, inserción o sustitución, que incluye una sustitución de aminoácido de esta y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de esta.

Como se usa en esta memoria, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Como se usa en esta memoria, una “composición farmacéutica” se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en esta memoria con otros componentes químicos como vehículos y excipientes fisiológica y farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En esta memoria, el término “ingrediente activo” se refiere a la IL-31 o una proteína de fusión que comprende IL-31 o a un complejo que comprende la IL-31 o la proteína de fusión que comprende IL-31, o al agente capaz de regular al alza la IL-31, o a un agonista del receptor de la IL-31, cualquiera de los cuales es responsable del efecto biológico como se describe en esta memoria. Además, se incluyen constructos que incluyen ácido nucleico que la codifica.

En lo sucesivo, las frases “vehículo fisiológicamente aceptable” y “vehículo farmacéuticamente aceptable”, que se pueden usar indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no cause irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases.

En esta memoria, el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilén glicoles.

En algunas realizaciones, se puede incluir la secuencia de la IL-31 o una proteína de fusión de esta en un complejo donde está unida a restos proteicos (p. ej., secuencia de aminoácidos heteróloga) o no proteicos (p. ej., PEG), cada uno de los cuales es capaz de prolongar la vida media de la composición mientras está en circulación.

Dicha molécula es altamente estable (resistente a la actividad proteolítica in vivo, probablemente debido a impedimento estérico conferido por el resto no proteico) y se puede producir usando síntesis en fase sólida común. Todavía se pueden usar técnicas recombinantes, por las que el producto peptídico se somete a modificación in vitro (p. ej., PEGilación como se describe más adelante en esta memoria).

- La frase "resto no proteico", como se usa en esta memoria, se refiere a una molécula que no incluye aminoácidos unidos mediante enlace peptídico que está unida a la secuencia de aminoácidos de la IL-31 descrita anteriormente. De acuerdo con algunas realizaciones, el resto no proteico puede ser un polímero o un copolímero (sintético o natural). Los ejemplos no limitantes del resto no proteico incluyen polietilén glicol (PEG) o derivado de este, Polivinil pirrolidona (PVP), albúmina, copolímero de éter divinílico y anhídrido maleico (DIVEMA); ácido polisialico (PSA) y/o poli(anhídrido comaleico de estireno) (SMA). Además, se pueden usar complejos que pueden proteger la IL-31 del entorno y así mantener su estabilidad, que incluyen, por ejemplo, liposomas o micelas que contienen IL-31, agonista del receptor de IL-31, un agente que regula al alza la IL-31 o una proteína de fusión que comprende la misma también se pueden usar en la invención.
- 5 Por "un agente que es agonista de los receptores de IL-31" o "agonista del receptor de IL-31" se entiende cualquier agente que se une a un receptor de IL-31 y produce una respuesta biológica como se define en esta memoria. Tal agente puede ser una proteína, una pequeña molécula, un anticuerpo y similares.
- De acuerdo con algunas realizaciones, la IL-31 o la proteína de fusión que comprende IL-31 está unida a un resto no proteico que puede actuar como un agente potenciador de liberación sostenida. Los agentes potenciadores de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico (HA), ácido alginico (AA), polihidroxietil metacrilato (Poly-HEMA), glima y poliisopropilacrilamida.
- 15 La unión del componente de la secuencia de aminoácidos de la IL-31 o la proteína de fusión que comprende la misma a otros agentes no aminoacídicos puede ser mediante enlace covalente o mediante acomplejamiento no covalente, por ejemplo, por acomplejamiento con un polímero hidrofóbico, que se puede degradar o escindir produciendo un compuesto capaz de liberación sostenida, mediante atrapamiento de la parte de aminoácidos de la IL-31 o de la proteína de fusión que comprende esta en liposomas o micelas que producen un complejo que comprende la IL-31 o la proteína de fusión que comprende esta. La asociación puede ser mediante el atrapamiento de la secuencia de aminoácidos dentro del otro componente (liposoma, micela) o la introducción de la secuencia de aminoácidos dentro de un polímero para producir el péptido final.
- 20 En algunas realizaciones, el derivado de PEG son ésteres de N-hidrosuccinimida (NHS) de ácidos carboxílicos de PEG, también se puede usar éster succinimidílico de PEG carboximetilado (SCM-PEG), derivados carbonato de benzotriazol de PEG, éteres de glicidilo de PEG, p-nitrofenil carbonatos de PEG (PEG-NPC, como metoxi PEG-NPC), aldehídos de PEG, PEG-ortopiridil-disulfuro, PEGs activados con carbonildimidazol, PEG-tiol, PEG-maleimida, PEG-vinilsulfona (VS), PEG-acrilato (AC) o PEG-ortopiridil disulfuro.
- 25 El resto no proteico se puede unir a la secuencia de aminoácidos de la IL-31 en cualquier posición elegida, siempre que se retenga la actividad terapéutica de la IL-31.
- En algunas realizaciones, las moléculas conjugadas de IL-31 se separan, se purifican y se califican usando, p. ej., cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- 30 Las moléculas para usar en la presente invención se pueden sintetizar bioquímicamente como usando técnicas de fase sólida estándar. Estos métodos incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, los métodos de síntesis en fase sólida parcial, la condensación de fragmentos y la síntesis en solución clásica.
- Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª ed., Pierce Chemical Company, 1984).
- 35 En los casos en que se desean grandes cantidades de péptidos, se pueden producir usando técnicas recombinantes como las descritas por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544; Studier et al., (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89; Brisson et al., (1984) *Nature* 310: 511-514; Takamatsu et al., (1987) *EMBO J.* 6: 307-311; Coruzzi et al., (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680; Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843; Gurley et al., (1986) *Mol. Cell Biol.* 6: 559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463.
- 40 En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende la IL-31 como se define en esta memoria junto con una o más moléculas que alargan la vida media de la IL-31 en el plasma. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende la IL-31 y una proteína que estabiliza la IL-31 o la protege en el torrente sanguíneo o en el tejido. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende la IL-31 unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina.
- 45 En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende IL-31 e IgG. La IgG puede ser cualquiera de las subclases o isotipos de esta, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Por ejemplo:
- Cadena pesada gamma de inmunoglobulina de *Mus musculus* (cds parciales de DQ381548)

GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATC
 TGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAA
 GGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCT
 GGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCA
 GTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGC
 TCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCA
 TTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATA
 ACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGC
 GGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCT
 ACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTG
 CTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACT
 CTCTGGTAAA (SEQ ID NO: 4).

ARNm de la cadena H de la IgG de Homo sapiens, (cds parciales de AB776838)

GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
 CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGT
 CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
 AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 5).

5 En algunas realizaciones, el término “anticuerpo” se refiere a la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo. En la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, esta forma es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada una de las cuales comprende los dominios de inmunoglobulina V_L y C_L , y cada cadena pesada que comprende los dominios de inmunoglobulina V_H , $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$. En cada par, las regiones variables de la cadena ligera y la pesada (V_L y V_H) son juntas responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes (C_L , $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$, particularmente $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$) son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos de longitud completa pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende los dominios de inmunoglobulina V_H , $C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$. Por “inmunoglobulina (Ig)” en esta memoria se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener varias formas estructurales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud

completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos V_H, C_γ1, C_γ2, C_γ3, V_L, C_L, Fab y Fc.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos se pueden dividir en "subclases" (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

10 En algunas realizaciones, un constructo que incluye una secuencia de ácido nucleico para la IL-31 como se define en esta memoria, por ejemplo, SEQ ID N°. 2 y una secuencia de ácido nucleico de IgG, por ejemplo, SEQ ID N°. 5 se pueden usar en el constructo. En algunas realizaciones, la IL-31 y la IgG se fusionan directamente entre sí.

15 La albúmina sérica también puede participar en el alargamiento de la vida media a través de módulos con la capacidad de interactuar no covalentemente con la albúmina. En estas estrategias, un resto de unión a albúmina se conjuga o se fusiona genéticamente con la proteína terapéutica. Se conocen proteínas con actividad de unión a la albúmina de ciertas bacterias. Por ejemplo, la proteína G estreptocócica contiene varios dominios pequeños de unión a la albúmina (ABD) compuestos por aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (6 kDa). La fusión de un ABD con una proteína da como resultado una vida media muy larga (véase Roland E Kontermann, strategies for extended serum half-life of protein therapeutics, Current Opinion in Biotechnology 2011, 22: 868-876).

20 En algunas realizaciones, la IL-31 y la IgG y/o cualquier otra proteína que se puede usar para prolongar la vida media de la IL-31 en el suero están unidas por un enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador es una secuencia de entre 2 y 20 aminoácidos.

25 En algunas realizaciones, el enlazador es una secuencia de entre 4-12 aminoácidos que forma un sitio de escisión para enzimas como MMP9/2, tripsina, PSA, catepsinas, calicreínas, serín proteasas, caspasas y otras. Se presentan sitios adicionales posibles de escisión en CHOI et al., "Protease-Activated Drug Development", Theranostics, Vol. 2(2), págs. 156-178 (se encuentran en <http://www.thno.org/v02p0156.pdf>). En algunas realizaciones, el enlazador está entre 6-8 aminoácidos y en algunas realizaciones incluye un sitio de escisión para enzimas como MMP9/2, tripsina, PSA, catepsinas, calicreínas, serín proteasas, caspasas y/u otras.

30 En algunas realizaciones, el enlazador que comprende un sitio de escisión de MMP-9/2, catepsina, tripsina, calicreínas, serín proteasas, caspasas o cualquier otra enzima de escisión que se pueda añadir entre la IL-31 y la IgG. Por ejemplo, se puede proporcionar una secuencia de los siguientes aminoácidos entre la IL-31 y la IgG: -Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln- (SEQ ID N°. 7, para el sitio de escisión de MMP-9/2), -Lys-Lys-Phe-D-Ala-ε-ácido maleimidocaproilo (SEQ ID N°. 8, para el sitio de escisión de catepsina B); -Lys-Gly-Ala-Ser-D-Arg-Phe-Thr-Gly- (SEQ ID N°. 9, para el sitio de escisión de tripsina); o ε-ácido maleimidocaproico-Arg-Arg-Ser-Ser-Tyr-Tyr-Ser-Gly- (SEQ ID N°. 10, para el sitio de escisión de PSA).

35 En esta memoria también se describen ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en esta memoria, así como vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y células transformadas con estos vectores.

40 Brevemente, la proteína de fusión se prepara de la siguiente manera: se introduce en las células huésped un constructo de expresión (es decir, vector de expresión), que incluye un polinucleótido aislado (es decir, aislado de una fuente natural de este, p. ej., SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 3 Gene ID: 386653 (para seres humanos) y 76399 (para ratón) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la IL-31 (que incluye opcionalmente un enlazador) fusionado en marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la IgG p. ej., AB776838 (para seres humanos, base de datos de NCBI) o DQ38154 (para ratón, base de datos de NCBI) o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4, respectivamente, colocados bajo el control transcripcional de un elemento regulador, como un promotor.

45 Por ejemplo, se liga en marco de lectura una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la IL-31 (p. ej., la SEQ ID N°. 1 o la SEQ ID N°. 6, Gene ID. 386653 (para seres humanos) o 76399 (para ratón) con una secuencia de ADNc de la inmunoglobulina (p. ej., AB776838 (para seres humanos) y DQ38154 (para ratón)).

En algunas realizaciones, cuando se requiere un sitio de escisión para enzimas, se añade al constructo una secuencia de ácido nucleico que codifica p. ej., una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nos. 7-10.

50 Se apreciará que también se puede usar la ligación de fragmentos genómicos de inmunoglobulina. En este caso, la fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de inmunoglobulina para la expresión. Se pueden aislar los ADNcs que codifican las regiones constantes de la cadena pesada de la IgG en base a las secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc, derivadas de linfocitos de bazo o de sangre periférica mediante técnicas de hibridación o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden ligar en tándem las secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de la IL-31 y de la inmunoglobulina dentro de un constructo de expresión (vector) que dirige la expresión eficaz en las células huésped seleccionadas, que se describe más adelante en esta memoria. Para

- la expresión en células de mamífero se pueden usar vectores basados en pRK5 [Schall et al., Cell, 61: 361-370 (1990)]; y vectores basados en CDM8 [Seed, Nature, 329: 840 (1989)]. Se puede crear la unión exacta eliminando las secuencias adicionales entre los codones de unión diseñados usando mutagénesis de eliminación dirigida por oligonucleótidos [Zoller et al., Nucleic Acids Res., 10: 6487 (1982); Capon et al., Nature, 337: 525-531 (1989)]. Se pueden usar oligonucleótidos sintéticos en los que cada mitad es complementaria a la secuencia en cualquier lado de la unión deseada; de manera ideal, estos son de 11 a 48-mers. Alternativamente, se pueden usar técnicas de PCR para unir las dos partes de la molécula en marco de lectura con un vector apropiado.
- Los métodos para introducir el constructo de expresión en una célula huésped son bien conocidos en la técnica e incluyen electroporación, lipofección y transformación química (p. ej., fosfato cálcico). Véase también el Ejemplo 5 de los Ejemplos, sección a continuación, así como en la sección de Procedimientos Experimentales en el mismo.
- Las células "transformadas" se cultivan en condiciones adecuadas que permiten la expresión de la molécula química codificada por la secuencia de ácido nucleico.
- Después de un periodo de tiempo predeterminado, la molécula química expresada se recupera de la célula o del cultivo celular y se efectúa la purificación de acuerdo con el uso final del polipéptido recombinante.
- Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, se pueden usar en el vector de expresión cualquiera de los elementos de transcripción y traducción adecuados que incluyen promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción y similares [véase, p. ej., Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544].
- Además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada (que codifica la quimera), el constructo de expresión también puede incluir secuencias diseñadas para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o efectividad de la proteína de fusión expresada.
- Se pueden usar una variedad de células procariontas y eucariotas como sistemas huésped de expresión para expresar la secuencia que codifica la proteína de fusión. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos como bacterias transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contiene la secuencia que codifica la quimera; levaduras transformadas con vectores de expresión en levadura que contienen la secuencia que codifica la quimera; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes como el plásmido Ti que contiene la secuencia que codifica la quimera. También se pueden usar para expresar la quimera sistemas de expresión en mamíferos.
- La elección de la línea de la célula huésped para la expresión de las moléculas depende principalmente del vector de expresión. Se prefieren los sistemas de expresión eucarióticos (p. ej., mamíferos e insectos) ya que permiten modificaciones post traduccionales (p. ej., glicosilación). Otra consideración es la cantidad de proteína que se requiere. A menudo se pueden producir cantidades de miligramos mediante transfecciones transitorias. Por ejemplo, la línea celular humana de riñón embrionario 293 transformada con el adenovirus EIA se puede transfectar transitoriamente con vectores basados en pRK5 mediante una modificación del método de fosfato de calcio para permitir una expresión eficiente. Se pueden usar vectores basados en CDM8 para transfectar células COS mediante el método del DEAE-dextrano (Aruffo et al., Cell, 61: 1303-1313 (1990); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. US, 9: 347-353 (1990)]. Si se desean mayores cantidades de proteína, se pueden expresar las moléculas después de la transfección estable de una línea celular huésped (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos). Se apreciará que la presencia de una secuencia líder hidrofóbica en el extremo N-terminal de la molécula asegurará el procesamiento y la secreción de la molécula por las células transfectadas.
- Se apreciará que puede ser preferible el uso de sistemas huésped de bacterias o levaduras para reducir el coste de producción. Sin embargo, ya que los sistemas huésped bacterianos están desprovistos de mecanismos de glicosilación de proteínas, puede ser necesaria una glicosilación de postproducción.
- De acuerdo con algunas realizaciones, las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir la molécula quimera recombinante. Dicho medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfatos asimilables y sales minerales, metales y otros nutrientes apropiados, como las vitaminas. Las células se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.
- Dependiendo del vector y del sistema huésped usado para la producción, las proteínas resultantes pueden permanecer dentro de la célula recombinante, secretadas en el medio de fermentación, secretadas en un espacio entre dos

membranas celulares como el espacio periplásmico en *E. coli*; o retenidas en la superficie exterior de una membrana celular o viral.

Después de un tiempo predeterminado en el cultivo, se ve afectada la recuperación de la proteína recombinante. La frase "recuperar la proteína recombinante" se refiere a recoger todo el medio de fermentación que contiene la proteína y no implica necesariamente etapas adicionales de separación y purificación. Las proteínas se pueden purificar usando una variedad de técnicas de purificación estándares de proteínas, como, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase reversa, cromatografía de concanavilina A, electroenfoco y solubilización diferencial.

- 5 Las moléculas para usar en la presente invención se recuperan preferiblemente en forma "sustancialmente pura". Como se usa en esta memoria, "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones, descrita a continuación en esta memoria.

15 Las moléculas recombinantes se pueden convenientemente purificar mediante cromatografía de afinidad. La idoneidad de la Proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que se usa en la quimera. Se puede usar la Proteína A para purificar moléculas quiméricas que están basadas en las cadenas pesadas .gamma.1, .gamma.2 o .gamma.4 humanas [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62: 1-13 (1983)]. La Proteína G se usa preferiblemente para todos los isotipos de ratón y para la gamma.3 humana [Guss et al., *EMBO J.*, 5: 1567-1575 (1986)]. El soporte sólido al que se une el ligando de afinidad es con mayor frecuencia agarosa, pero también hay otros soportes sólidos disponibles. Los soportes sólidos mecánicamente estables como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Las condiciones para unir las moléculas quiméricas a la columna de afinidad de proteína A o G vienen dictadas exclusivamente por las características del dominio Fc; es decir, su especie e isotipo. Generalmente, cuando se elige el ligando apropiado, la unión eficaz se produce directamente a partir del fluido de cultivo no condicionado. Una característica distintiva de las moléculas quiméricas es que, para las moléculas .gamma.1 humanas, la capacidad de unión para la proteína A está algo disminuida en relación con un anticuerpo del mismo tipo Fc. Las moléculas quiméricas unidas se pueden eluir eficazmente ya sea a pH ácido (a o por encima de 3,0) o en un tampón de pH neutro que contiene una sal levemente caotrópica. Esta etapa de cromatografía de afinidad puede dar como resultado una preparación de molécula quimérica que es >95% pura. Es esencial la pureza de grado médico para aplicaciones terapéuticas.

- 20 Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica en lugar de, o además de, cromatografía de afinidad en proteína A o G para purificar moléculas quiméricas que incluyen una porción de inmunoglobulina. Dichas moléculas quiméricas se comportan de manera similar a los anticuerpos en la cromatografía tiorfílica en gel [Hutchens et al., *Anal. Biochem.*, 159: 217-226 (1986)] y cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados [Al-Mashikhi et al., *J. Dairy Sci.*, 71: 1756-1763 (1988)]. Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos, su comportamiento en las columnas de intercambio iónico viene dictado no solo por sus puntos isoeléctricos sino también por un dipolo de carga que puede existir en las moléculas debido a su naturaleza quimérica.

Las moléculas descritas anteriormente son preferiblemente no inmunogénicas para maximizar la eficacia terapéutica.

- 40 Como se usa en esta memoria, el término "no inmunogénico" se refiere a una sustancia que es sustancialmente incapaz de producir una respuesta inmune en un sujeto administrado con este. Por ejemplo, no inmunogénico en un ser humano significa que tras poner en contacto la molécula quimérica con el tejido apropiado de un ser humano no se demuestra ningún estado de sensibilidad o resistencia a la molécula quimérica tras la segunda administración de la molécula quimérica después de un periodo latente apropiado (p. ej., 8 a 14 días).

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

- 45 Las rutas adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecales, intraventriculares directas, intracardiácas, p. ej., inyecciones en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.
- 50 Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular específica de un paciente.

- Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

5 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, se usan en la formulación los penetrantes apropiados para permear la barrera. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

10 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos después de agregar los auxiliares adecuados si se desea, para obtener
15 tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetil celulosa sódica y/o polímeros fisiológicamente aceptables como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal de este, como alginato de sodio.

20 Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilén glicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de las tabletas o grageas para la identificación o para
25 caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

30 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un plastificante como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste pueden contener los ingredientes activos mezclados con rellenos como lactosa, aglutinantes como almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los
35 ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados como aceites grasos, parafina líquida o polietilén glicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas o formuladas de manera convencional.

35 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos se distribuyen convenientemente en forma de una presentación en spray aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, se puede determinar la unidad de dosificación proporcionando una válvula para distribuir una cantidad
40 medida. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para usar en un dispensador se puede formular que contenga una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

45 La composición farmacéutica descrita en esta memoria se puede formular para administración parenteral, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis con un conservante convencional añadido opcionalmente. Las formulaciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos y pueden
contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

50 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección apropiadas a base de agua o aceite. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las soluciones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la
suspensión, como la carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la
preparación de soluciones altamente concentradas.

55 De acuerdo con algunas realizaciones, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p.ej., solución a base de agua estéril libre de pirógenos antes del uso.

La composición farmacéutica también se puede formular en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, que usan, p. ej., bases de supositorio convencional como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (IL-31) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (enfermedad o cáncer relacionado con la angiogénesis) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica y depende de la gravedad de la enfermedad, su tipo, el modo de administración y similares.

Para cualquier preparación para usar en la invención, se puede estimar la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia de los ingredientes activos descritos en esta memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivos celulares y de estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para usar en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, ruta de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista del estado del paciente. (Véase p. ej., Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1).

Se pueden ajustar la cantidad y el intervalo de dosificación de forma individual para asegurar los niveles del ingrediente activo suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima eficaz, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de los datos in vitro. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser una sola o una pluralidad de administraciones con un plan de tratamiento que puede durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que se lleve a cabo la cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar será, por supuesto, dependiente del sujeto a tratar, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del criterio del médico que prescribe, etc.

Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, como un kit aprobado por la FDA que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contiene el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. El envase o dispensador también se puede admitir una notificación asociada con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones de administración a seres humanos o en veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser del etiquetado aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. para la prescripción de medicamentos o de un prospecto de producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, colocado en un envase apropiado y etiquetado para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla con más detalle anteriormente.

Ejemplos

Procedimientos experimentales usados en los ejemplos

Cultivo celular

Se usaron las líneas celulares MC38 de carcinoma de colon murino y 4T1 de carcinoma de mama murino (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y dentro de los 6 meses de la reanimación. Las líneas celulares se crecieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina al 1%, piruvato sódico al 1% y estreptomycin, penicilina y neomicina en solución al 1% (10 mg/ml, Biological Industries, Israel).

Ensayo de viabilidad celular Alamar Blue™

Se evaluó la viabilidad celular de manera cuantitativa con el colorante metabólico indicador AlamarBlue™ (Serotec Ltd., Oxford, Reino Unido) que determina la actividad metabólica de las células y se usa para la viabilidad y la proliferación celular como se describió anteriormente en Voloshin T, Gingis-Velitski S, Bril R, Benayoun L, Munster M, Milsom C, Man S, Kerbel RS, Shaked Y (2011) G-CSF supplementation with chemotherapy can promote revascularization and subsequent tumor regrowth: prevention by a CXCR4 antagonist (Blood 118 (12): 3426-3435). Se recogieron las células de cultivos sub-confluentes y se volvieron a sembrar en placas (500-1000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos) en su medio designado y solución de Alamar Blue™ (AB) al 10%. En algunos experimentos se

añadió IL-31 recombinante humana o de ratón (Peprotek, Israel) en concentraciones crecientes (generalmente 0,5 ng-20 ng/ml). Los resultados se corrigieron con los valores de fondo de los controles negativos. Los resultados se presentan como un porcentaje de reducción de AB calculados mediante la ecuación apropiada. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se presentaron como medias \pm error estándar.

5 Transferencia de Western (Western Blot)

Se analizaron cincuenta μ g de proteínas mediante un gel de SDS/PAGE al 10%, transferido a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente hibridado con anticuerpo de IL-31 de ratón (5 μ g/ml, Abcam) o anticuerpo IL-31 humano (5 μ g/ml, Abcam) y normalizado con anticuerpo monoclonal de actina de ratón (1:5.000, MP Biomedicals).

Regulación a la baja de IL-31 por shARN

- 10 Se construyeron cuatro clones de shRNA de secuencia específicos para la IL-31 murina o control de shRNA (vector aleatorizado vacío) por Applied Biological Materials (Canada). Se transfectaron las células a una confluencia del 60%. Se logró la transfección usando FuGENE V R 6 (Roche, Penzberg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, se incubaron las células en medio de crecimiento que contenía puromicina (1 μ l/ml) para seleccionar transfectantes estables. Después de dos semanas de selección, se evaluó el silenciamiento génico mediado por shRNA de IL-31 para cada clon usando análisis de Western blot.
- 15

Citometría de flujo

- Se tiñeron inmunológicamente células tumorales, macrófagos o células obtenidas a partir de tumores seguido de un procedimiento de suspensión de células individuales como se describió anteriormente en Adini A, Fainaru O, Udagawa T, Connor KM, Folkman J, D'Amato RJ (2009) Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis in vivo. J. Immunol. Methods 342 (1-2): 78-81, con las siguientes mezclas de anticuerpos: Para el análisis de células endoteliales : CD45-/CD31+/VEGFR2+; para MDSCs: Gr-1+, CD11b+; para macrófagos M1 (F4/80+CD11c+CD206-) y para macrófagos M2 (F4/80+CD11c-CD206+). Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Biosciences o BioLegend (San Diego, CA). Los experimentos se realizaron en un citómetro de flujo Cyan-ADP (Beckman Coulter, Suiza) y se analizaron con la versión Summit 4.3 (Beckman Coulter).
- 20

25 Procesamiento de tejido y tinción inmunológica

- Los tumores (se incluyeron en OCT y se seccionaron posteriormente. Se usaron crio secciones de 10 μ m para el análisis de densidad de microvasos (MVD) y la colonización de macrófagos en el tejido. Para células endoteliales, se usó el anticuerpo anti-CD31 como marcador endotelial específico (1:200, BD Biosciences) junto con un anticuerpo secundario conjugado Cy3 (1:500, Jackson immunoresearch laboratories). Para macrófagos, se usó anticuerpo anti-F4/80 conjugado con FITC como marcador específico de macrófagos (1:200, BD Biosciences). Se contaron el número de estructuras de vasos o células por campo y se representaron (al menos 5 campos por tumor, n>20 campos por grupo).
- 30

Modelos de tumor

- Se inyectaron células MC38 de carcinoma colorectal murino (2×10^6) por vía subcutánea en el costado de ratones hembra BALB/c de 5 a 6 semanas de edad (Harlan, Israel). Se inyectaron ortotópicamente células 4T1 de carcinoma de mama murino (5×10^5) en la almohadilla de grasa mamaria de ratones BALB/c hembra de 6 semanas de edad. Se evaluó el tamaño del tumor regularmente con calibradores Vernier usando la fórmula ancho² X longitud X 0,5. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Tecnología Technion-Israel.
- 35

40 Bombas osmóticas

- Se usaron minibombas osmóticas in vivo para permitir la administración continua de IL-31 recombinante a ratones durante un periodo de dos semanas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, cuando los tumores alcanzaron 150-200 mm³ se inició el tratamiento mediante la implantación subcutánea de minibomba osmótica (#1002, Alzet, Cupertino, CA) cargada con IL-31 recombinante de ratón (en una concentración total de 0,7 μ g por día) o PBS como un control de vehículo. El procedimiento se realizó en condiciones estériles. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la implantación de la bomba y se evaluaron adicionalmente como se describe en el texto.
- 45

Construceto IL-31-IgG

- Se sintetizó la secuencia de ADN correspondiente a la proteína IL-31 madura con su péptido señal para la secreción en base a la tecnología gBlocks Gene Fragment de IDT y se insertó en el vector de expresión NSPI. La cadena pesada de la IgG1 de ratón (bisagra-CH2-CH3) se clonó corriente abajo de la IL-31 y corriente arriba a myc-His6. Brevemente, se aisló ARN total de bazo de ratón usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen). Se sintetizó ADNc monocatenario usando transcriptasa inversa M-MLV (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificó la cadena pesada IgG1 de ratón (bisagra-CH2-CH3) usando PCR. Los cebadores usados fueron: sentido (5'-TACCGCTCGAGGTGCCAGGGATTGTGGTTG-3) (SEQ ID N°. 11) y antisentido (5'-
- 50

CGTTTCAATTTACCAGGAGAGTGGG-3) (SEQ ID N°. 12). El fragmento de PCR proporciona un tamaño de ~700 Kb. El plásmido resultante, NSPI-IL-31-mIgG-myc-His, se verificó mediante mapeo de restricción y secuenciación. Los plásmidos se transfectaron en células de ovario de hámster chino (CHO) usando FuGENE V R 6 (Roche, Penzberg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, las células se incubaron en un medio de crecimiento que contenía puromicina (1 μ l/ml) para seleccionar los transfectantes estables. Se probó el medio condicionado de células transfectadas con CHO para determinar la inhibición de la viabilidad celular.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como desviación media estándar (DE). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba t de Student de dos colas o ANOVA de una vía como se describe en el texto. La significación se estableció en valores de *, 0,05 >p>0,01; **, 0,01>p>0,001; y *** p<0,001.

Ejemplo 1:

La IL-31 afecta a la proliferación y viabilidad celular del tumor

Se analizaron los lisados celulares de líneas celulares tumorales que incluyen EMT6, P3, MPC, CT26, B16, LLC, K7M2, 4T1 y MC38 para la expresión de IL-31 así como para el receptor de IL-31 (IL-31R) usando western blot.

Como se detalla en esta memoria y como se presenta en la Figura 1 (A-G), la IL-31 inhibe la proliferación de células tumorales de manera dependiente de la IL-31. La Figura 1A muestra lisados celulares de líneas de células tumorales que se analizaron para determinar la expresión del receptor de IL-31 así como del de IL-30 (IL-31R) usando análisis de western blot. Particularmente, los resultados en la Figura 1A muestran que mientras la IL-31 se expresó fuertemente en líneas celulares MC38 y K7M2, se expresó mínimamente en células P3, MPC, B16 y 4T1. Además, el IL31R muestra patrones de expresión elevados en la mayoría de las células no metastásicas cuando se compara con las células altamente metastásicas, lo que demuestra un patrón de expresión bajo.

A continuación se usaron líneas celulares MC38 y 4T1 como dos células representativas que expresan ya sea IL-31 o no, respectivamente, para evaluar adicionalmente el posible efecto de la IL-31 sobre la proliferación y viabilidad de las células tumorales. La viabilidad celular se evaluó en presencia de IL-31 recombinante (rIL-31) mediante Alamar Blue. Los resultados en las Figuras 1B-E demuestran que la adición de rIL-31 inhibió fuerte y significativamente la proliferación celular en MC38, CT26 y HCT116 cuando se comparó con el control, un efecto que estuvo ausente en el caso de células 4T1 (Figura 1C). Además, se realizó el recuento de células en estas células y reveló que el número de células viables se redujo significativamente en MC38 en presencia de IL-31, pero no en células tumorales 4T1 cultivadas con IL-31 (Figuras 1F y 1G). Estos resultados sugieren que la IL-31 afecta a la viabilidad celular al inhibir la proliferación celular pero solo en algunas líneas de células tumorales, lo que sugiere una distinta dependencia de las células tumorales en la expresión de IL-31 y/o IL-31R.

Ejemplo 2:

La falta de IL-31 en células tumorales promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis

Para confirmar aún más la actividad de la IL-31 en células tumorales *in vivo*, se silenció la IL-31 en células MC38 usando la técnica de ARNi.

Como se refiere en detalle en esta memoria, la Figura 2 presenta que el shARN para la IL-31 inhibe la expresión de la IL-31 en células tumorales. La Figura 2A muestra que los lisados de células MC38 de carcinoma de colon murino después de que se transfectaron de manera estable con plásmidos aleatorizados o plásmidos que contienen shARN para la IL-31 se evaluaron para la expresión de IL-31 usando análisis de western blot. El gráfico en la Figura 2B muestra el porcentaje de reducción en la expresión de IL31 en MC38 shIL-31 después de que se normalizó a su expresión en el control MC-38 aleatorizado, según lo evaluado mediante densitometría.

Como se puede ver en la Figura 2B, el nivel de expresión de la IL-31 en células MC38 shIL-31 se redujo en más del 60% en comparación con las células MC38 control.

Como se detalla adicionalmente en esta memoria, la Figura 3 presenta que la falta de expresión de IL-31 promueve el crecimiento tumoral, la angiogénesis y los TAMs. Dos millones de células MC38 aleatorizadas control, o sus homólogas shIL-31 MC38 se inyectaron subcutáneamente en los costados de ratones C57B1/6. En la Figura 3A, se evaluó el crecimiento tumoral con regularidad usando un calibrador. En el punto final, los tumores se extrajeron, se seccionaron y, a continuación, se tiñeron inmunológicamente con CD31, como un marcador de células endoteliales (Figura 3B). La tinción nuclear se determina mediante DAPI. En un experimento en paralelo, los tumores se extrajeron en el punto final y se prepararon como suspensión de células individuales para la evaluación de células endoteliales (células CD31+) y macrófagos (células F4/80+) usando citometría de flujo. Se presenta el porcentaje de células CD31+ (C) y de células F4/80+ (3D). **, 0,05<p<0,01 (Figuras 3 C-D).

Los resultados en la Figura 3A muestran que el crecimiento tumoral se mejoró significativamente en los tumores MC38 shIL-31 cuando se compara con sus homólogos de MC-38 aleatorizados. En el punto final, los tumores se extrajeron

y se analizaron para determinar la densidad de microvasos (MVD). Se observó un aumento significativo en la MVD en tumores de células MC38 siIL-31 cuando se compararon con tumores control (Figura 3B). Además, se detectaron estructuras de vasos grandes en tumores de tumores MC38 siIL-31 cuando se compararon con los homólogos MC38 control (Figura 3B). Estos resultados se confirmaron aún más cuando los tumores se prepararon como suspensión de células individuales y se analizaron mediante citometría de flujo de CD31.

Estudios recientes indican que las células derivadas de médula ósea (BMDC) que colonizan tumores pueden afectar a la angiogénesis. Se ha encontrado que los macrófagos asociados a tumores (TAMs), por ejemplo, contribuyen significativamente a la angiogénesis tumoral y, posteriormente, promueven el crecimiento del tumor. Por consiguiente, se comparó la colonización por macrófagos de tumores de células MC38 shIL-31 con tumores control. El número de macrófagos (células F4/80+) y de células endoteliales (células CD31+) fue significativamente mayor en los tumores shIL-31 cuando se comparó con los tumores control ev-aleatorizados (Figuras 3C y 3D). En conjunto, estos resultados sugieren que la falta de IL-31 en tumores que previamente expresaban IL-31 promovió el crecimiento tumoral, aumentó la angiogénesis y ayudó a la colonización de tumores por macrófagos.

Ejemplo 3:

La IL-31 induce actividad anti-tumoral en ambos tumores MC38 y 4T1

Como se detalla en esta memoria, la Figura 4 presenta la inhibición del crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis por IL-31. Dos millones de células MC38 se implantaron en los costados de ratones C57B1/6 y medio millón de células 4T1 se implantaron en la almohadilla de grasa mamaria de ratones BALB/c y se dejaron crecer hasta que alcanzaron los 150-200 mm³, momento en el que se les implantaron a los ratones minibombas que contenían PBS (control) o 0,7 µg/día de IL-31 recombinante (rIL-31). Se evaluó el crecimiento del tumor regularmente para (Figura 4A) MC-38 y (Figura 4B) 4T1. Para probar si la adición de IL-31 recombinante puede inhibir el crecimiento de tumores, se usaron tanto células MC38, que se sabe que expresan IL-31, como células 4T1, que no expresan IL-31. Con este fin, se implantaron subcutáneamente dos millones de células MC38 en los costados de ratones C57/Black (n=5/grupo) y se implantaron ortotópicamente medio millón de células 4T1 en la almohadilla de grasa mamaria de ratones BALB/c (n=5/grupo). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~150 mm³, se infundió de manera continua IL-31 recombinante de ratón en los ratones usando bombas osmóticas como se explicó anteriormente (n=5/grupo). Las minibombas osmóticas implantadas subcutáneamente se cargaron con IL-31 recombinante que se liberó a una dosis de 0,7 µg por día. Se usaron minibombas cargadas con control de vehículo (PBS) en ratones control (n=5). El crecimiento tumoral se evaluó de forma regular o en el punto final. En ambos grupos de ratones, la infusión continua de IL-31 dio como resultado una reducción significativa en el tamaño del tumor cuando se comparó con los tumores control (Figura 4A y 4B). Además, en el punto final, se extrajeron los tumores MC38, se seccionaron y luego (Figura 4C) se tiñeron inmunológicamente con CD31, como un marcador de célula endotelial. La tinción nuclear se determina por DAPI. La Figura 4D muestra la cuantificación del número de microvasos que se presenta en el gráfico.

Cuando se extrajeron los tumores MC38 y se evaluó la densidad de microvasos (MVD) se observó una disminución de la MVD en los tumores de ratones que se sometieron a infusión de IL-31 en comparación con los controles que se les inyectó control de vehículo (véase Figuras 4C y 4D). Es importante destacar que, como se sabe que el modelo de tumor 4T1 metastatiza agresivamente en los pulmones de los ratones, se extrajeron en el punto final los tumores de todos los grupos (n=5 ratones/grupo) y se analizaron los pulmones para detectar lesiones metastásicas. En el caso de los tumores 4T1, se extrajeron en el punto final los pulmones de los ratones y se evaluaron las lesiones metastásicas usando tinción H&E de secciones de pulmón (Figura 4E). Como se muestra en la Figura 4E, se observó un número significativamente menor de lesiones metastásicas pulmonares en ratones infundidos con IL-31 recombinante cuando se compararon con los pulmones de ratones infundidos con PBS. En conjunto, estos resultados sugieren que la infusión continua de IL-31 de ratón tiene numerosas actividades antitumorales en el tumor y sus sitios metastásicos.

En la Figura 4F se proporciona la cuantificación del número de lesiones metastásicas por campo. ***, p<0,001. En la Figura 4G se les implantaron células HCT116 de carcinoma de colon humano (2 x 10⁶ células; n=5 ratones/grupo) a los ratones NOD-SCID. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 50 mm³, a los ratones se les implantaron bombas que contenían 150 µg de proteína hIL31-IgG o se inyectaron ip dos veces a la semana con 50 µg de hIL-31-IgG. El crecimiento del tumor se evaluó a lo largo del tiempo. Los resultados muestran que ambas metodologías de tratamiento dieron como resultado una inhibición significativa en el crecimiento del tumor. Después de 2 semanas de tratamiento, se extrajeron y se seccionaron los tumores. Las secciones del tumor se tiñeron para CD31, un marcador de célula endotelial, y se evaluó la densidad de microvasos contando el número de vasos por campo. Como se muestra en la figura, el número de microvasos en los tumores tratados fue significativamente menor que en los tumores control. (4H-I) Los tumores HCT116 se extrajeron en el punto final después de que los ratones se trataran con hIL-31-IgG durante 2 semanas ya sea por bomba o por inyecciones IP. Los tumores se seccionaron y se tiñeron para CD31 (un marcador de célula endotelial – en rojo) Figura 4H. En la Figura 4I se proporciona la cuantificación del número de vasos – densidad de microvasos (MVD) por campo. Como se observa en 4H-I, los tumores de ratón tratados con IL31-IgG (ya sea por inyección o en bomba) tienen una densidad de microvasos más baja que los tumores de control, lo que sugiere una actividad antiangiogénica de IL-31.

Ejemplo 4:

Los macrófagos se inclinan hacia un fenotipo M1 en presencia de IL-31

Los resultados *in vivo* sugirieron además que la IL-31, además de sus efectos sobre la vasculatura del tumor y la inhibición de la viabilidad de las células tumorales, como se muestra *in vitro*, puede actuar también como un factor que puede alterar la colonización de los tumores por los macrófagos. Para evaluar si la IL-31 puede alterar las propiedades fenotípicas de los macrófagos, se llevó a cabo un experimento centrado en dos fenotipos de macrófagos específicos, conocido como fenotipo proinflamatorio M1 (CD206-/CD11c+) y fenotipo antiinflamatorio M2 (CD206+/CD11c-). Con este fin, se cultivaron líneas celulares de macrófagos murinos J774 en presencia o ausencia de IL-31 recombinante durante 48 horas. Posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de macrófagos M1 y M2.

Como se detalla en esta memoria, la Figura 5 presenta: la IL-31 promueve la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1. (A) Se cultivaron líneas de macrófagos murinos J774 en medio libre de suero en presencia o ausencia de 100 ng de IL-31 recombinante durante 24 horas. Después de 48 horas, las células se tiñeron inmunológicamente con F4/80, CD206 y CD11c para evaluar el porcentaje de macrófagos M1 (CD11c+/CD206-) y M2 (CD11c-/CD206+). Se proporcionan los gráficos. (B) Los tumores MC38 implantados en C57B16 que, ya expresen IL-31 (evaluados) o no (shIL-31), se dejaron crecer hasta el punto final. Luego se extrajeron los tumores y se prepararon como una suspensión de células individuales, y se analizó el porcentaje de macrófagos M1 y M2 colonizadores de tumores usando citometría de flujo. (C) Se implantaron dos millones de células MC38 en los costados de ratones C57B1/6. Cuando los tumores alcanzaron 150-200 mm³, se les implantaron a los ratones minibombas que contenían PBS (control) o IL-31 recombinante en una dosis de 0,7 µg/día (rIL-31). En el punto final, los tumores se extrajeron y se prepararon como suspensión de células individuales. El porcentaje de macrófagos colonizadores de tumores M1 y M2 se analizó mediante citometría de flujo. **, 0,05<p<0,01; ***, p<0,001.

Los resultados en la Figura 5A revelaron un aumento significativo en el fenotipo M1 y una disminución en el fenotipo M2 en células J774 cultivadas en presencia de IL-31 en comparación con células control.

A continuación, se volvió a examinar la colonización de macrófagos en ratones con tumores MC-38 (n=5/grupo), que no expresan IL-31 (tumores shIL31) o que se implantaron en ratones infundidos con IL-31 recombinante (n=5/grupo), ambos comparados con los ratones control (n=5). Los resultados en la Figura 5B muestran un fenotipo invertido de los macrófagos M1 y M2 que colonizan tumores shIL-31 y control, es decir, el porcentaje de macrófagos M1 se redujo significativamente y el porcentaje de macrófagos M2 se incrementó significativamente en el microentorno de los tumores que carecen de la expresión de IL-31 (shIL-31) cuando se comparan con tumores control. Además, los tumores de ratones infundidos con IL-31 recombinante revelaron que el porcentaje de macrófagos M2, pero no de los macrófagos M1, colonizadores de MC38 se redujo significativamente en ratones infundidos con IL-31 recombinante en comparación con ratones infundidos con vehículo control (Figura 5C). Tomados en conjunto, los resultados sugieren que tanto *in vivo* como *in vitro* la IL-31 reduce el fenotipo de los macrófagos antiinflamatorios en los tumores.

Ejemplo 5:

El constructo IL-31-IgG inhibe la proliferación de células tumorales

Dado que la infusión continua de IL-31 reveló actividades antitumorales, se evaluó un constructo en el que se conjugó la IL-31 con inmunoglobulina para aumentar la vida media de la citoquina conjugada. La IL-31-IgG se preparó clonando un plásmido que contiene IL-31 conjugada con la cadena pesada de IgG1 de ratón (bisagra-CH2-CH3) para dar un producto de IL-31-mIgG-myc-His. El plásmido se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO). El medio condicionado de las células CHO transfectadas se colocó después en las células MC38 y luego se probó su actividad usando el ensayo Alamar Blue como se detalla en el Ejemplo 1.

Como se detalla en esta memoria, la Figura 6 presenta la viabilidad celular de MC38 que se evaluó usando el ensayo de Alamar Blue. Las células se cultivaron en presencia de dosis crecientes de mL-31-IgG. Se observó una reducción en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de IL-31-IgG.

Ejemplo 6:

Los tumores se pueden ver afectados por el tratamiento con el ligando de IL-31, que inhibe la viabilidad celular tumoral

Los niveles de expresión de IL-31R (receptor) en varios carcinomas de colon y mama humanos de pacientes con cáncer revelaron que muchos, pero no todos los tumores, expresan IL-31R. Por lo tanto, tales tumores se pueden ver afectados por el tratamiento con el ligando IL-31 que inhibe la viabilidad de las células tumorales como se muestra *in vitro*.

La Tabla 1 es un resumen de las biopsias de pacientes con cáncer de colon y de mama que se tiñeron inmunológicamente para IL-31R. La tabla muestra que la mayoría de las biopsias tienen tinción positiva (P) para IL-31R (N se refiere a tinción negativa). La intensidad de la tinción se representa por el número de signos "+" en cada muestra. La Figura 7 proporciona un ejemplo de tinción de una de las biopsias, que indica la alta expresión de IL-31R (en negro) en tejido carcinogénico. La Tabla 2 proporciona una serie de tejidos de tejido humano normal y tumoral de diversos orígenes, que indica los niveles de expresión de IL-31R en cada tejido. Se presenta la alta expresión de IL31R

ES 2 737 723 T3

en tejidos carcinogénicos de todos los orígenes. Sin embargo, en algunos tejidos normales también se presenta una alta expresión de IL31R. "T" significa tejido tumoral. "N" significa tejido normal.

Tabla 1. Biopsias de pacientes con cáncer de colon y de mama que se tiñeron inmunológicamente para IL-31R

Tipo de tejido/ Número de paciente	Tinción (P/N)	Intensidad de tinción
Biopsias de cáncer de colon	12/15 Positivos	
14-09085	P	++
14-07461	P	++++
14-05245	P	++
14-05087	P	++
14-04018	P	++++
14-03717	N	-
14-02841	P	+
14-01064	N	-
14-00670	P	++
14-00154	P	++
14-09531	P	++++
14-09428	N	+
14-09434	P	+++
14-09431	P	++++
14-09087	P	+++
Cáncer de mama	6/10 positivos	Intensidad de tinción
68482/10	N	-
19197/11	P	+
14994/14	N	-
32530/10	N	-
5378/10	P	++
8603/13	N	-
22782/14	P	++
49549/12	P	+++
29788/11	P	+++
9757/13	P	+
Biopsias de cáncer de mama	4/5 positivos	Intensidad de tinción
34735/12	P	++++
48685/09	P	+++
28176/10	P	++
1637/10	N	-
12855/11	P	+++

Tabla 2. IL-31R en tejido humano normal y tumoral de varios orígenes

Serie de tejidos de cáncer de la valoración			Comentario
Tipo de tejido	Tumoral (T)	Normal (N)	
Mama	4/6	1/2	La mayoría de los T son leves
Colon	6/7	2/3	La mayoría de los T son leves
Pulmón	8/8	3/3	Diferentes intensidades en T tinción leve en N
Riñón	8/8	5/5	N también está fuerte
Ovario	8/9	1/4	Diferente intensidad en T
Endometrio	5/5	2/3	T están intensos
Estómago	5/8*	0/0	*2 núcleos T son tejido conectivo
Piel	6/6	1/2	
Hígado	5/6*	5/5	*1 núcleo T es tejido conectivo

Los niveles de expresión de IL-31R en varios carcinomas de colon y mama humanos de pacientes con cáncer revelaron que muchos, pero no todos, los tumores expresan IL-31R. Por lo tanto, tales tumores se pueden ver afectados por el tratamiento con el ligando IL-31 que inhibe la viabilidad de las células tumorales como se muestra in vitro.

5

Ejemplo 7:

El IL-31-IgG está estabilizado durante al menos 72 horas en sangre periférica

Se probó la estabilidad de la proteína IL-31-IgG mediante la inyección a ratones C57B16 de 30 µg de las proteínas de IL-31 indicadas (tanto humanas como de ratón). Se extrajo la sangre por el seno retro-orbital en diferentes puntos temporales y se separó el plasma. Se usó plasma (2 µl) para detectar las diversas proteínas de IL-31 usando anticuerpos anti-His conjugados con HRP mediante Western Blot. A partir de las figuras 9G-9I se puede ver que las diferentes proteínas de IL-31-IgG se estabilizan durante al menos 72 horas en sangre periférica. Se observa además que la Figura 8 muestra que la IL-31-IgG se estabiliza durante al menos 72 horas en sangre periférica. Se transfectaron células 293T con el constructo IL-31-Ig (Figura 8A). Se obtuvieron el medio condicionado (CM) y los lisados después de 48 horas y después se detectaron para los diversos componentes del constructo de IL-31 mediante Western Blot. (Figura 8B-E). Detección de la parte mL-31 (Figura 8B), la parte mCH2-CH3-IgG (Figura 8C), la parte Myc (Figura 8D) y la parte His (Figura 8E) usando anticuerpos Cabra-a-Rata, C-a-m-IgG, C-a-m-ligera, C-a-m-ligera, respectivamente. Se muestra la tinción con Azul Brillante de Coomassie (CBB) de 20 mg de hIL-31-IgG y mL-31-IgG purificadas en la Figura 8 F. La proteína IL-31-IgG (humana y de ratón), que se generó y purificó, se ha probado para determinar su estabilidad en sangre periférica de ratones. Se inyectaron ratones C57B16 con 30 µg de las proteínas IL-31 indicadas. La sangre se extrajo por el seno retro-orbital en diferentes puntos temporales y se separó el plasma. Se usó plasma (2 µl) para detectar las diversas proteínas de IL-31 usando anticuerpos anti-His conjugados con HRP mediante Western Blot. (Figura 9G) 30 µg de mL31-IgG vs. 200 µg de mL31. (Figura 8H) 30 µg de hIL31-IgG vs. 200 µg de hIL31. (Figura 9I) 30 µg de hIL31-IgG vs. 200 µg de hIL31-PEG. hIL-31-PEG representa la proteína IL-31 purificada después de la PEGilación. La Figura 8G-H representa la farmacocinética de IL31-IgG en la sangre periférica de ratones. Muestra que, aunque la IL-31 está en su forma nativa, se elimina del sistema en 15 minutos, la IL31-IgG está presente de manera estable en la sangre periférica durante las primeras 72 horas.

10

15

20

25

Ejemplo 8:

La IL-31 inhibe directamente la angiogénesis

La IL-31 inhibe directamente la angiogénesis según se evaluó mediante un ensayo de formación de tubos:

30

Se sembraron células endoteliales vasculares umbilicales humanas (HUVECs) en placas de cultivo de tejidos de 48 pocillos recubiertas con Matrigel (4×10^4 células/pocillo) y se incubaron en medio M-199 con FBS al 20%. Los pocillos se cultivaron con 100 ng/ml de IL-31 recombinante humana o 10 µg/ml de IL-31-IgG humana. Las células se cultivaron y se capturaron las imágenes de contraste de fase de los tubos de microvasos después de 200 minutos a 100 aumentos con el Leica CTR 6000 (Leica Microsystems). Las imágenes se analizaron usando el paquete informático ImageJ y se cuantificaron por recuento del número de uniones HUVEC (bifurcaciones) por campo.

35

La Figura 9A muestra imágenes representativas de la formación de tubos de HUVECs en presencia de 100 ng/ml de IL-31 recombinante humana (rhIL31) o 10 μ g/ml de IL-31-IgG que se proporcionan en un punto de tiempo de 200 minutos. Se cuantificó y presentó el número de bifurcaciones por campo. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ como se muestra en la Figura 9B. Como se puede ver, la IL31 o la IL31IgG inhiben significativamente la formación de tubos.

5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FREMDER, Ella ARONHEIM, Ami SHAKED, Yuval

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN IL-31 Y USOS DE ESTA

5

<130> P-78034-USP

<160> 12

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 164

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu
20 25 30

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

Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu Glu Glu Lys Gly Val Leu Val
50 55 60

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

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

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

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

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

Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln
145 150 155 160

Gln Ala Thr Thr

20

<210> 2

<211> 495

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 2

ES 2 737 723 T3

atggcctctc actcaggccc ctcgacgtct gtgctctttc tgttctgctg cctgggaggc 60
 tggctggcct cccacacggt gcccgccgt ttactacgac caagtgatga tgtacagaaa 120
 atagtcgagg aattacagtc cctctcgaag atgcttttga aagatgtgga ggaagagaag 180
 ggcgtgctcg tgtcccagaa ttacacgctg ccgtgtctca gccctgacgc ccagccgcca 240
 aacaacatcc acagcccagc catccgggca tatctcaaga caatcagaca gctagacaac 300
 aaatctgtta ttgatgagat catagagcac ctcgacaaaac tcatatttca agatgcacca 360
 gaaacaaaca tttctgtgcc aacagacacc catgaatgta aacgcttcat cctgactatt 420
 tctcaacagt tttcagagt catggacctc gcactaaaat cattgacctc tggagcccaa 480
 caggccacca cttaa 495

<210> 3
 <211> 492
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 3
 atgatcttcc acacaggaac aacgaagcct accctgggtgc tgctttgctg tataggaacc 60
 tggctggcca cctgcagctt gtccttcggt gccccaatat cgaaggaaga cttagaact 120
 acaattgacc tcttgaaca agagtctcag gatctttata acaactatag cataaagcag 180
 gcatctggga tgtcagcaga cgaatcaata cagctgccgt gtttcagcct ggaccgggaa 240
 gcattaacca acatctcggc catcatagca catctggaga aagtcaaagt gttgagcgag 300
 aacacagtag atacttcttg ggtgataaga tggctaacaa acatcagctg tttcaaccga 360
 ctgaatttaa acatctctgt gcctggaaat actgatgaat cctatgattg taaagtgttc 420
 gtgcttacgg ttttaaagca gttctcaaac tgcatggcag aactgcaggc taaggacaat 480
 actacatgct ga 492

10

<210> 4
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 4
 gtgccaggg attgtggtg taagccttgc atatgtacag tcccagaagt atcatctgtc 60
 ttcatttcc ccccaaagcc caaggatgtg ctcaccatta ctctgactcc taaggtcacg 120
 tgtgttggtg tagacatcag caaggatgat cccgaggtcc agttcagctg gttttagat 180

ES 2 737 723 T3

gatgtggagg tgacacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcactttc 240
 cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa 300
 tgcagggtca acagtgcagc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa 360
 ggcagaccga aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag 420
 gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag 480
 tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat catggacaca 540
 gatggctctt acttctgcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga 600
 aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac tgagaagagc 660
 ctctcccact ctctctgtaa a 681

<210> 5
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 120
 acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
 atctccaaag ccaaaaggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 420
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 540
 cccgtgctgg actccgacgg ctctcttctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 696

10

<210> 6
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 6
 Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro

ES 2 737 723 T3

20 25 30

Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
 35 40 45

Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
 50 55 60

Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
 65 70 75 80

Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
 85 90 95

Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
 100 105 110

Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
 115 120 125

Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
 130 135 140

Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 145 150 155 160

Thr Thr Cys

- <210> 7
- <211> 8
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 7
- Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln
- 1 5
- 10
- <210> 8
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 15
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa es epsilon-maleimidocaproico
- 20
- <400> 8
- Lys Lys Phe Ala Xaa
- 1 5
- 25
- <210> 9
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa es D-arginina

<400> 9
 Lys Gly Ala Ser Xaa Phe Thr Gly
 1 5

5 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es epsilon-maleimidocaproico

15 <400> 10
 Xaa Arg Arg Ser Ser Tyr Tyr Ser Gly
 1 5

20 <210> 11
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 taccgctcga ggtgccagg gattgtggtt g 31

30 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

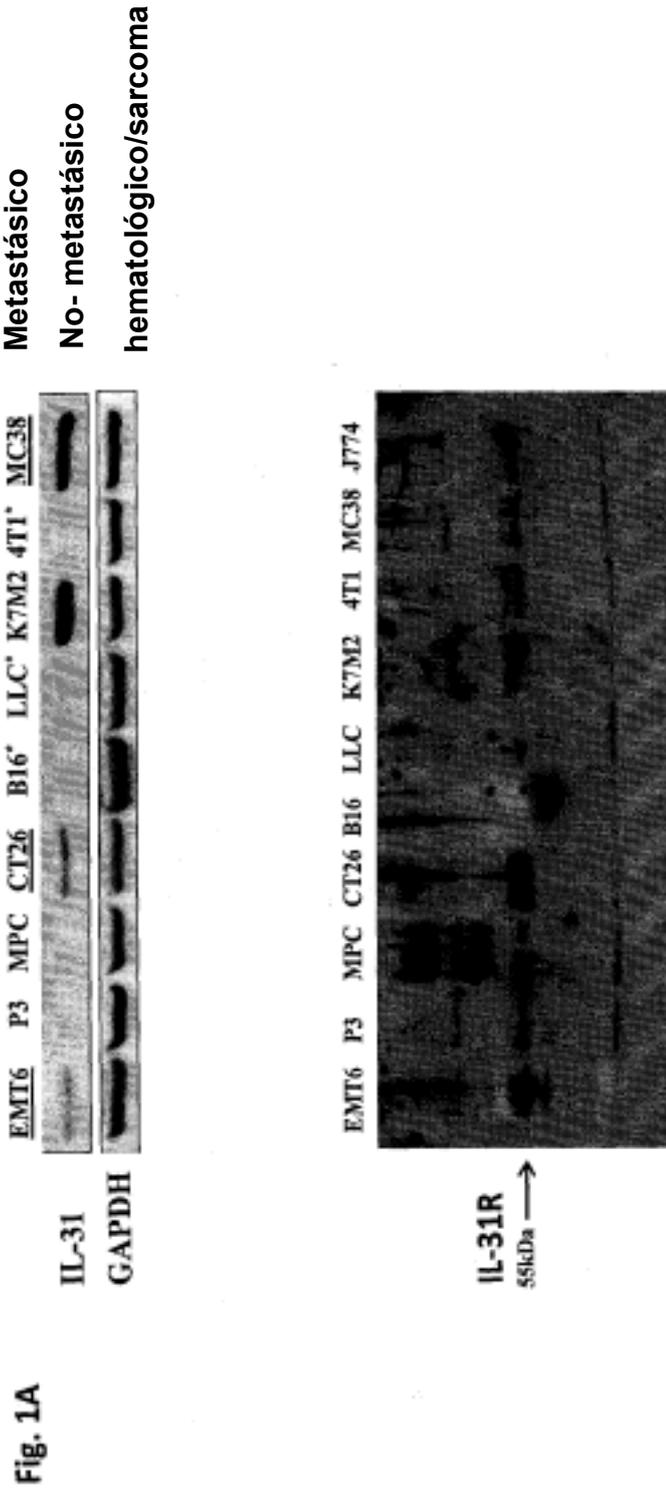
35 <220>
 <223> cebador

<400> 12
 cgttcgaatt taccaggaga gtggg 25

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. La IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, o un complejo que comprende IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende la IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 para usar en el tratamiento del cáncer que expresa un receptor de IL-31.
- 10 2. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer renal, cáncer biliar, cáncer prostático, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer de colon, cáncer de recto o cáncer de piel.
- 15 3. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el cáncer es cáncer de mama o cáncer de colon.
4. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hematológica seleccionada de mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC).
- 20 5. La IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, una proteína de fusión que comprende la IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1, o un complejo que comprende la IL-31 o péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 o una proteína de fusión que comprende la IL-31 o un péptido que es al menos aproximadamente un 70% homólogo a la secuencia de la IL-31 como se expone en la SEQ ID N°. 1 para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con la angiogénesis.
- 25 6. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el trastorno relacionado con la angiogénesis es cáncer, artritis, artritis reumatoide, placas ateroscleróticas, neovascularización del injerto de córnea, cicatrices hipertróficas o queloides, retinopatía proliferativa, retinopatía diabética, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), granulación, glaucoma neovascular, uveítis, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, asma, Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF), Mielofibrosis o Colangitis Primaria Esclerosante.
- 30



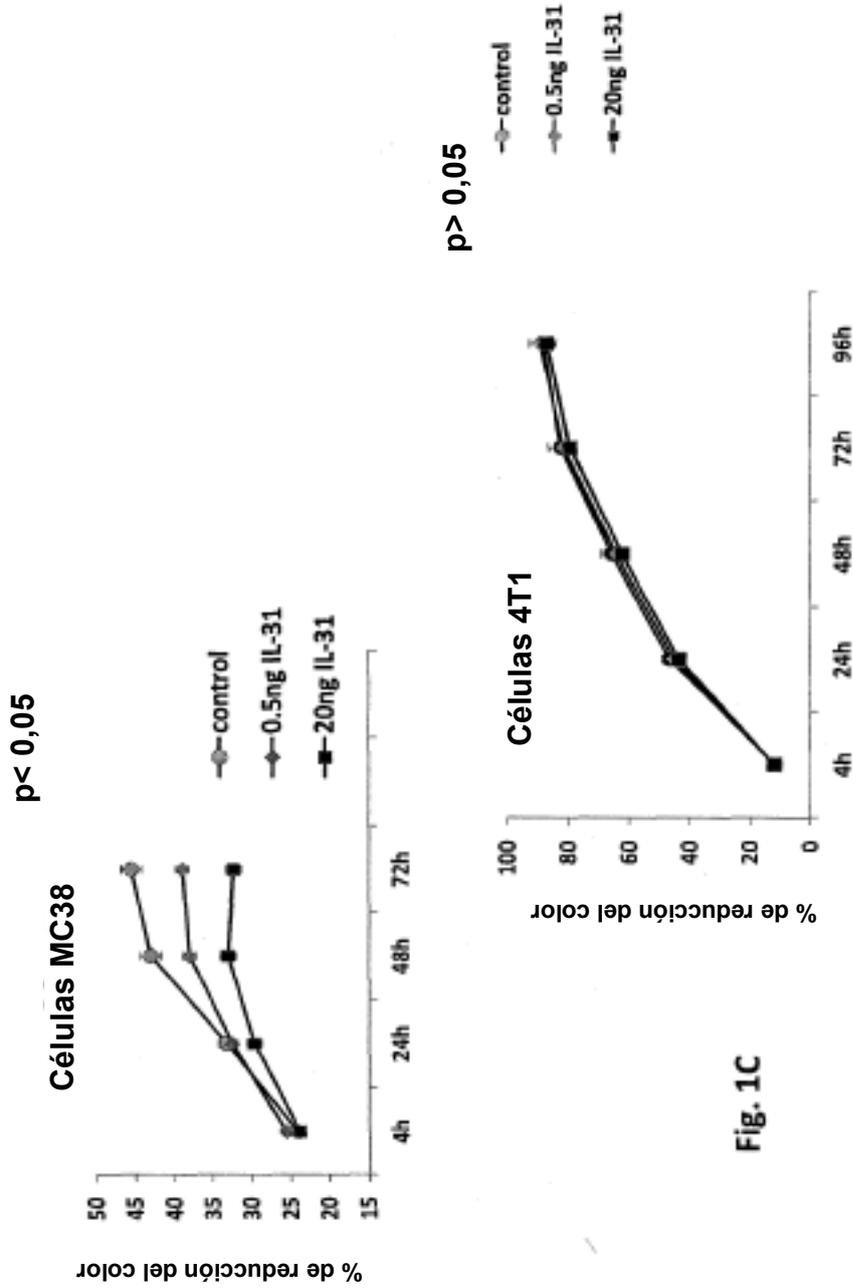
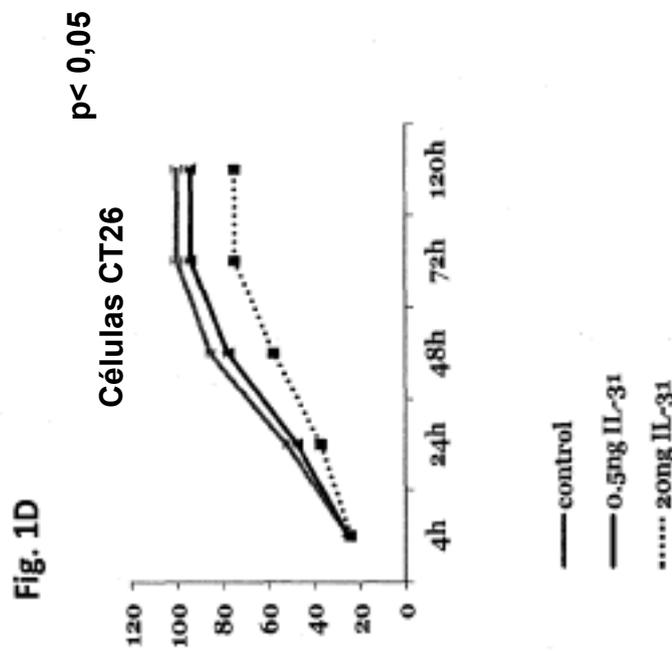
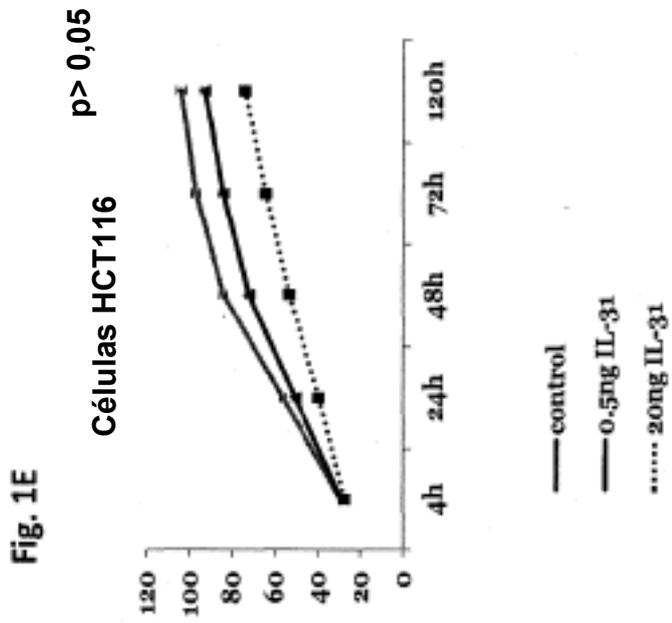
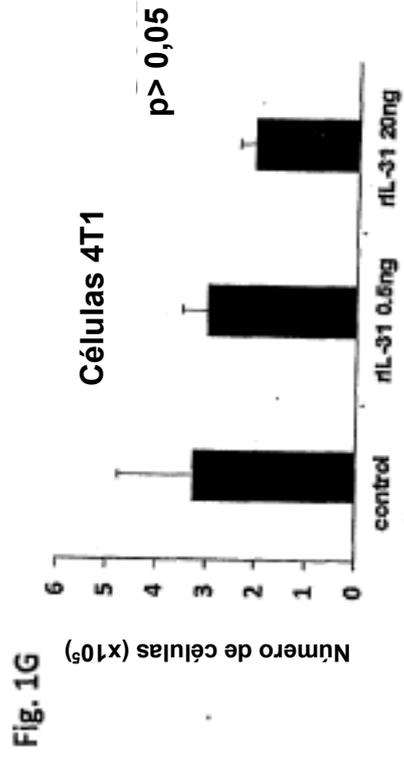
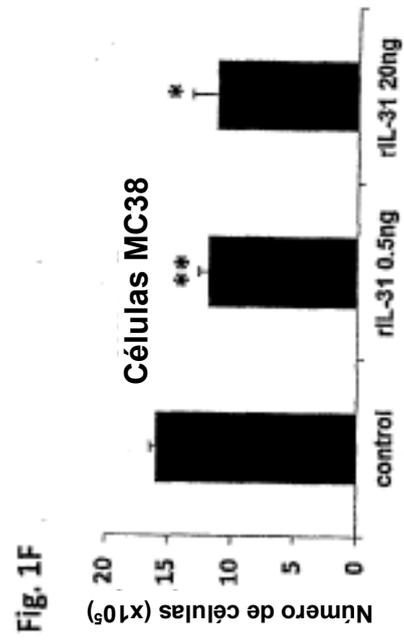


Fig. 1B

Fig. 1C





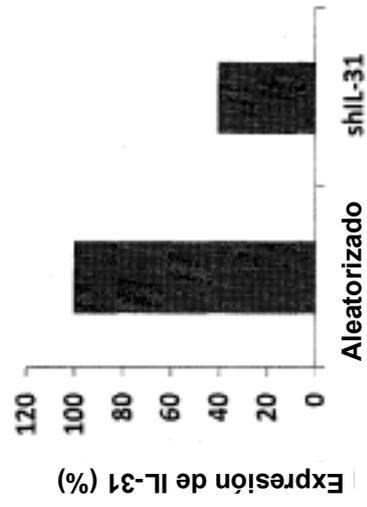


Fig. 2B



Fig. 2A

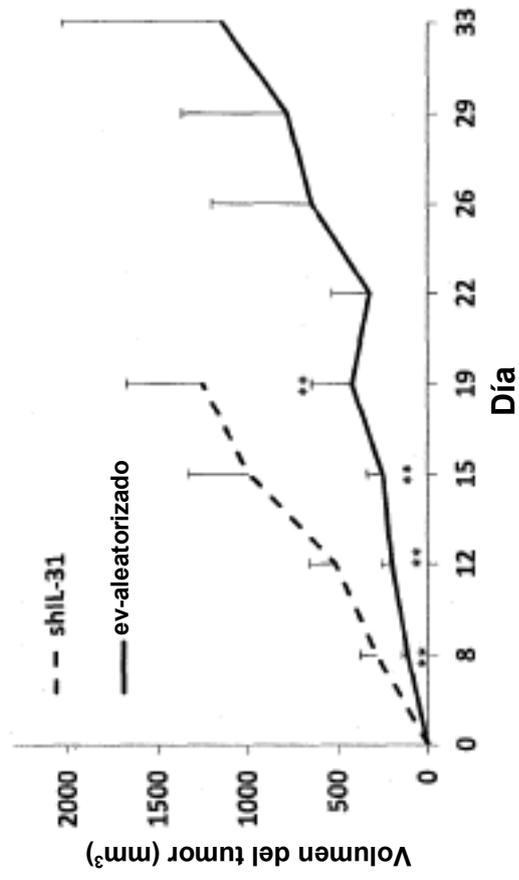


Fig. 3A

shIL-31



Aleatorizado



Fig. 3B

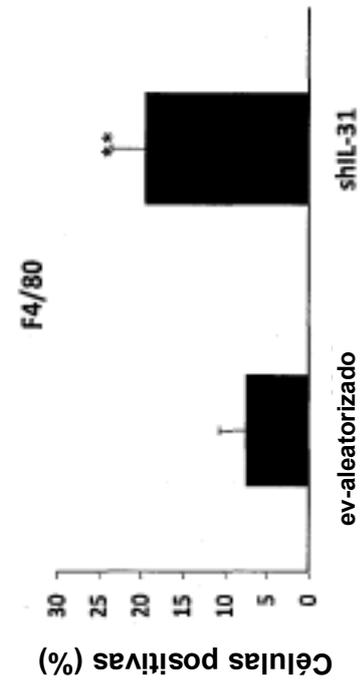


Fig. 3D

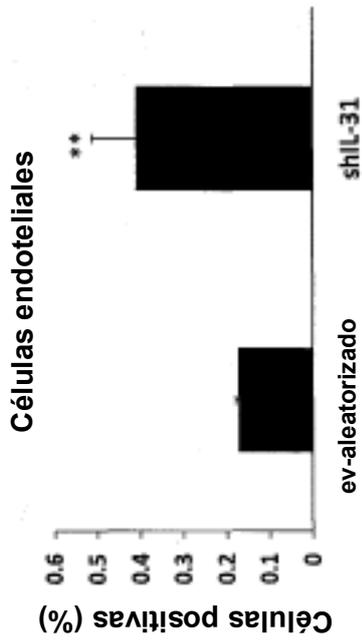


Fig. 3C

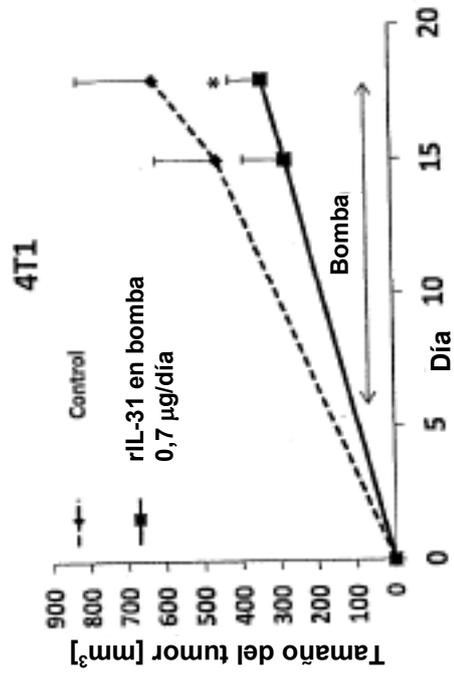


Fig. 4B

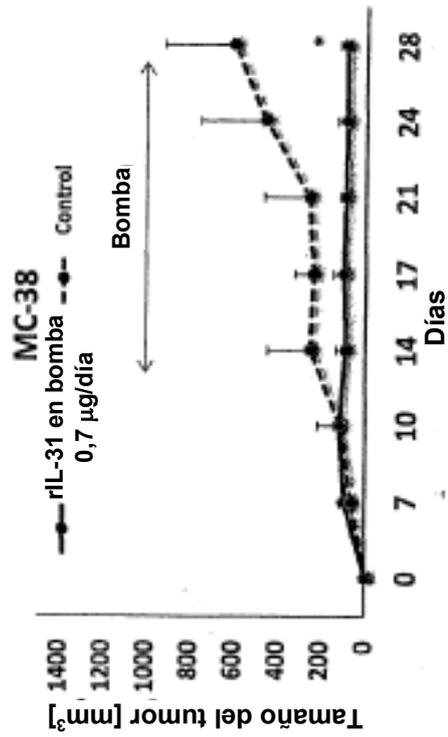


Fig. 4A

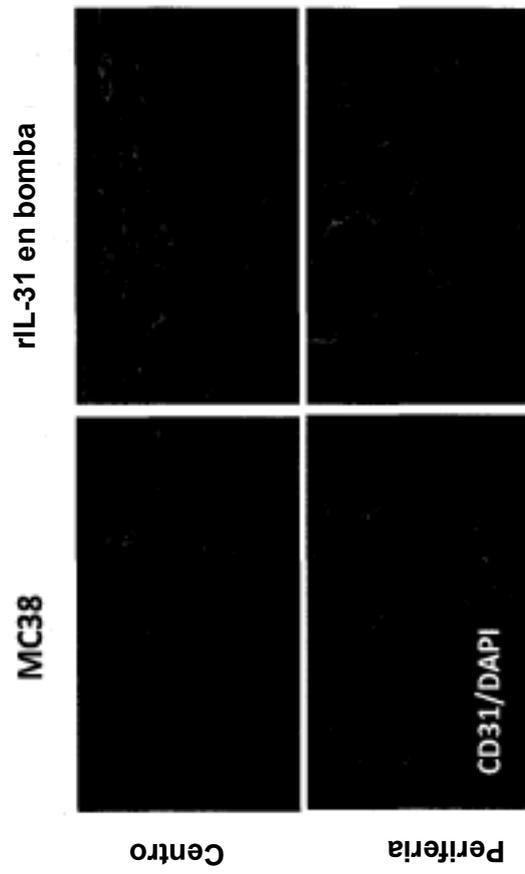


Fig. 4C

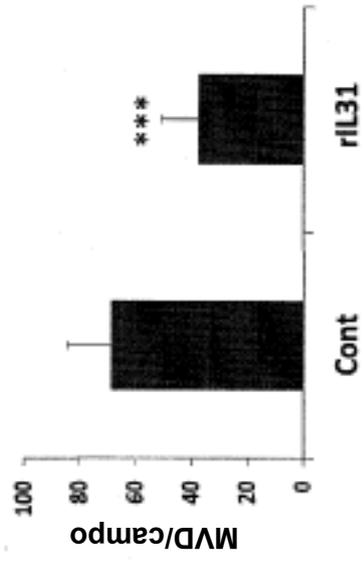
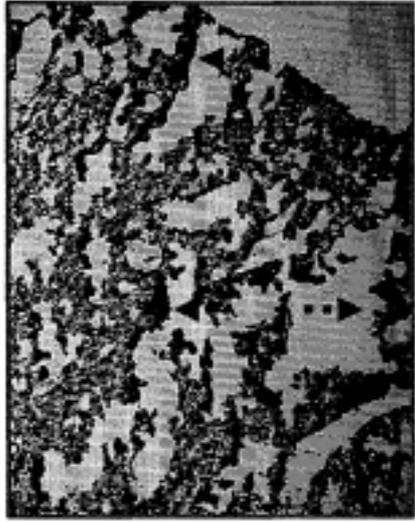


Fig. 4D



rIL-31 en bomba



4T1

Fig. 4E

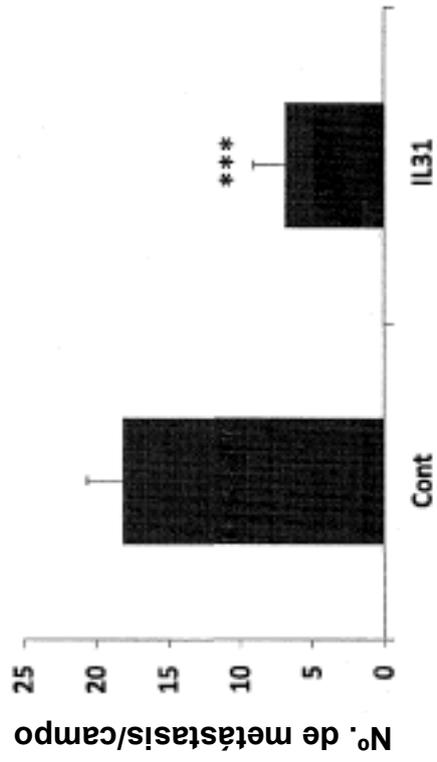
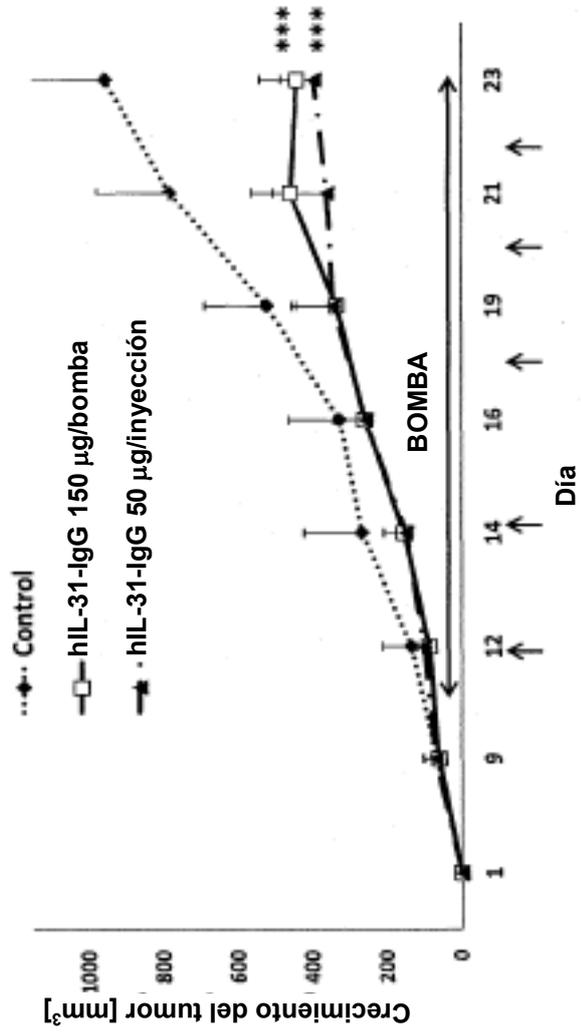
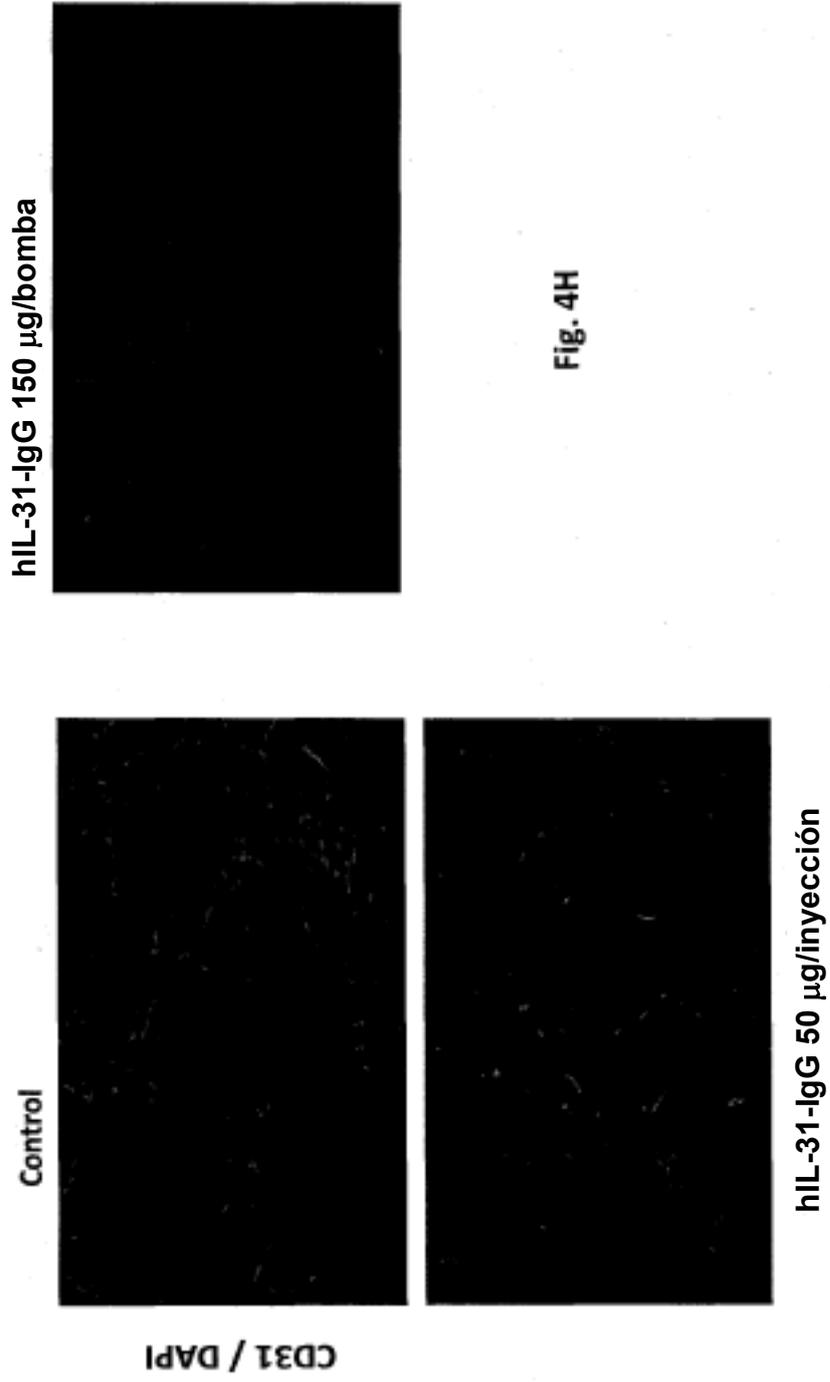


Fig. 4F

Fig. 4G





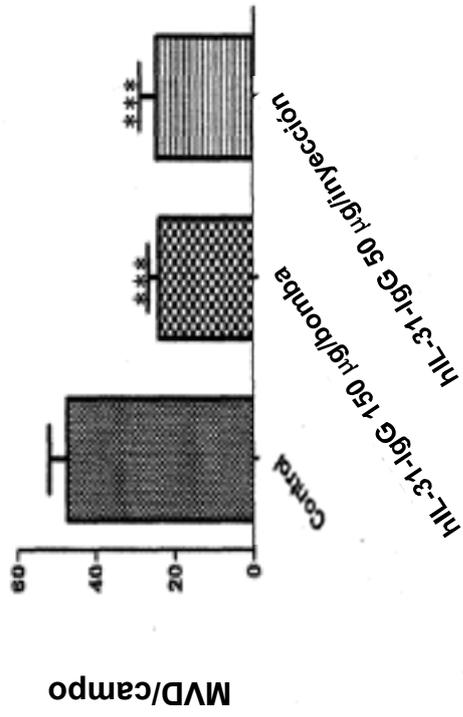


Fig. 4I

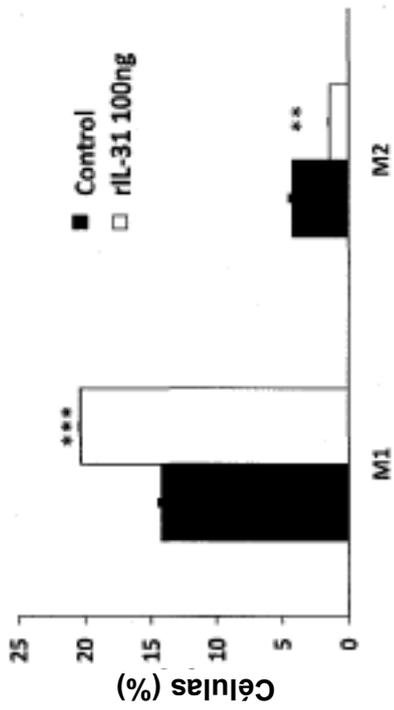


Fig. 5A

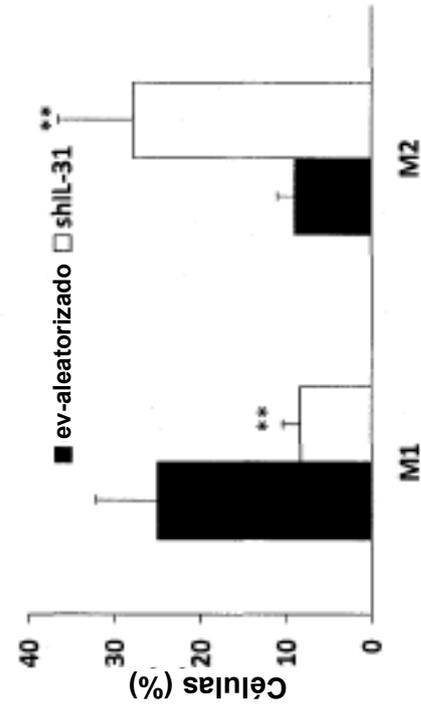


Fig. 5B

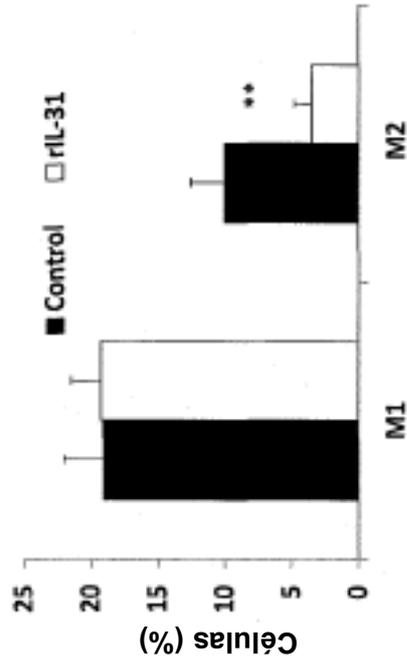
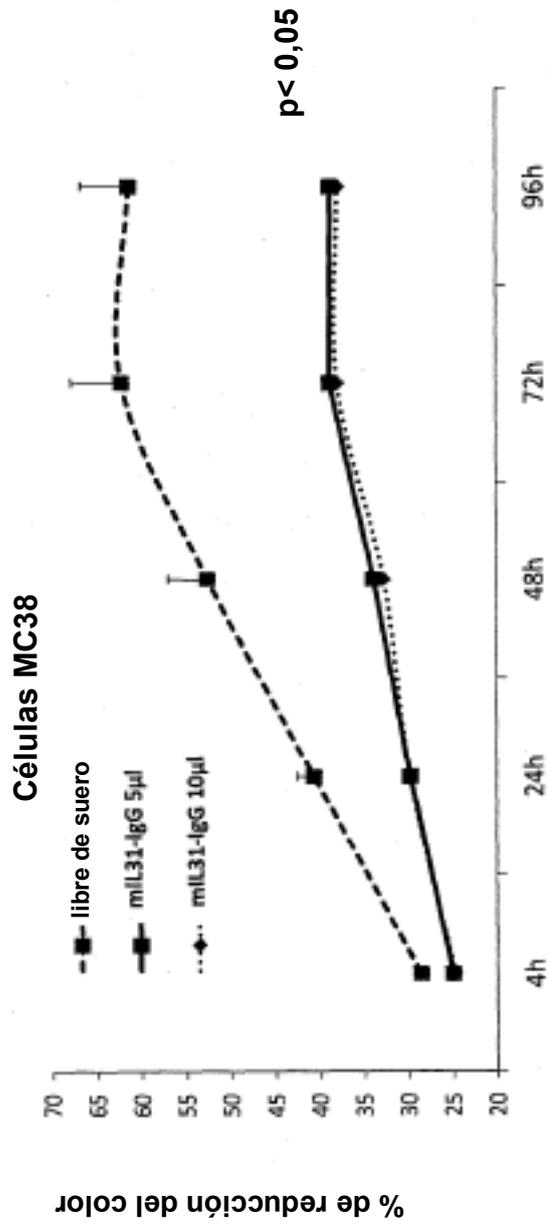


Fig. 5C

Figura 6





x20



x10

Figura 7

Fig. 8A

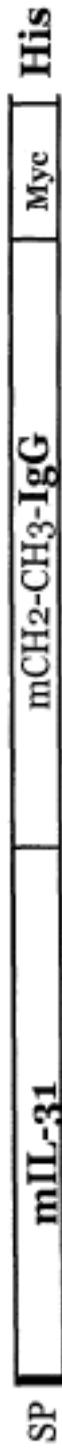


Fig. 8B

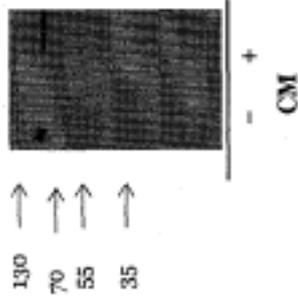


Fig. 8C

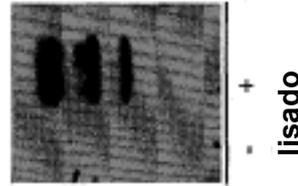


Fig. 8D

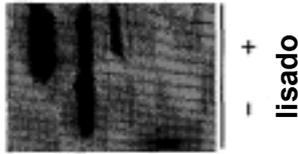


Fig. 8E

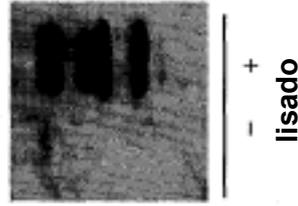
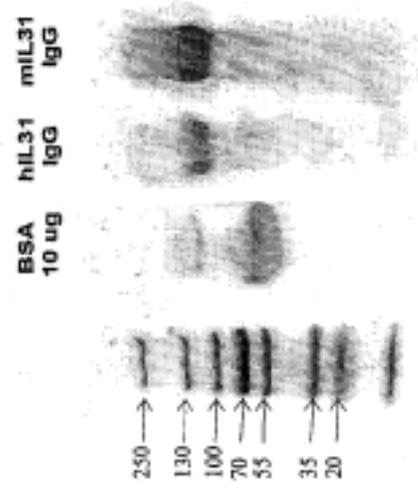


Fig. 8F



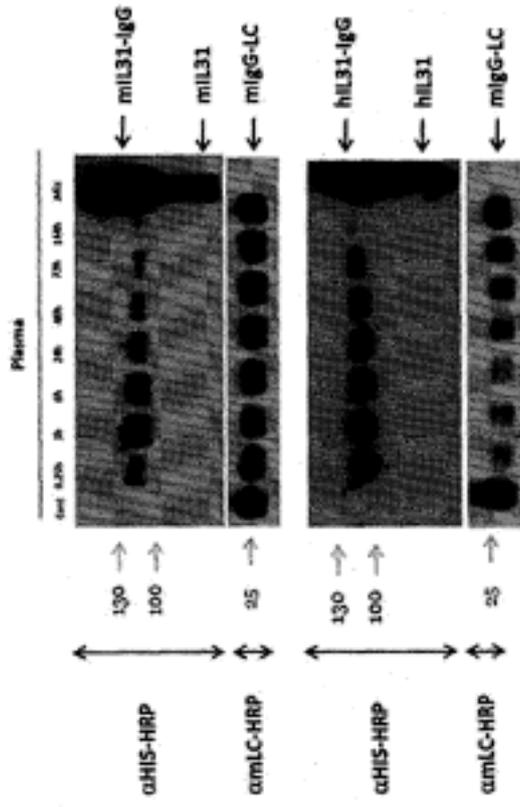


Fig. 8G

Fig. 8H



hIL31-IgG 10 µg/ml



rhIL31 100 ng/ml



Control

Fig. 9A

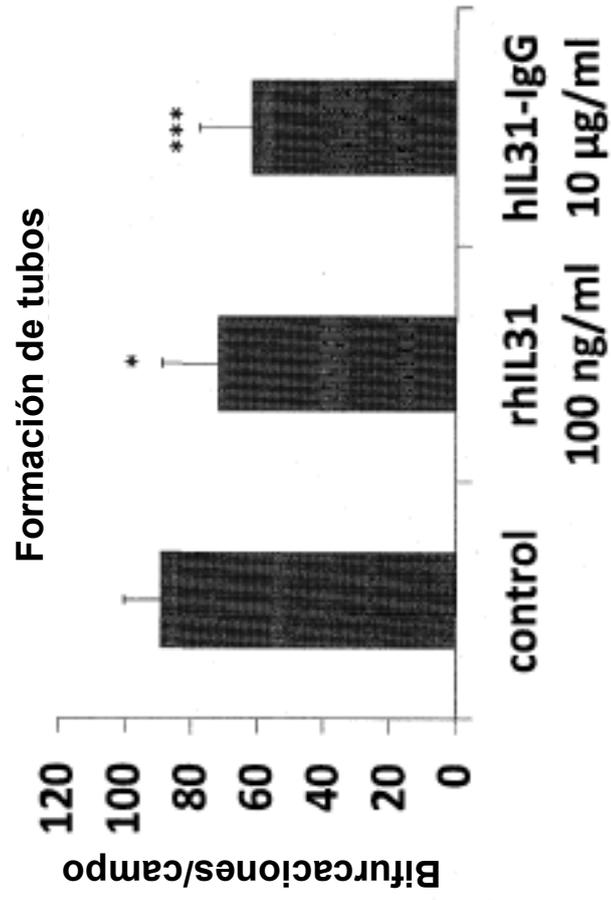


Fig. 9B