



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0712426-0 B1



(22) Data do Depósito: 08/06/2007

(45) Data de Concessão: 26/10/2021

(54) Título: USOS DE UM ANTICORPO ANTI-NR10/IL-31RA COM ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DE NR10/IL-31RA, DE UM FRAGMENTO E/OU UM FRAGMENTO QUIMICAMENTE MODIFICADO DO ANTICORPO E DE UM AGENTE

(51) Int.Cl.: A61K 45/00; A61K 39/395; A61P 1/04; A61P 1/16; A61P 11/06; (...).

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2006 JP 2006-160096.

(73) Titular(es): CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

(72) Inventor(es): MASAKAZU HASEGAWA; HIDETOMO KITAMURA; KEIKO KASUTANI; HIDEKI ADACHI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2007061625 de 08/06/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/142325 de 13/12/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/12/2008

(57) Resumo: PREVENÇÃO OU MEDICAMENTO PARA DOENÇA INFLAMATÓRIA. Os presentes inventores obtiveram, a partir de uma biblioteca de fagos de anticorpos humanos, um clone BM095 que expressa um anticorpo neutralizante anti-NR 10 de camundongo que mostra uma forte atividade supressora da proliferação em um sistema de ensaio de proliferação de célula Ba/F3 dependente de IL-31. Quando este anticorpo neutralizante anti-NR 10 de camundongo foi administrado a camundongos NC/Nga, um modelo de dermatite atópica que é um modelo de camundongo de dermatite crônica que surge como um resultado de aplicações repetidas cloreto de picrila, um modelo de camundongo de artrite reumatoide, e um modelo de camundongo de osteoartrite, um efeito significativo da supressão dos sintomas foi observado. Isso revelou que o anticorpo neutralizante anti-NR 10 é de fato eficaz como um agente terapêutico para doenças inflamatórias. Além disso, os presentes inventores obtiveram com sucesso um anticorpo neutralizante anti-NR 10 de humano, fornecendo agentes terapêuticos extremamente úteis com aplicações clínicas práticas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USOS DE UM ANTICORPO ANTI-NR10/IL-31RA COM ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DE NR10/IL-31RA, DE UM FRAGMENTO E/OU UM FRAGMENTO QUIMICAMENTE MODIFICADO DO ANTICORPO E DE UM AGENTE".

Campo Técnico

[0001] A presente invenção refere-se a novos agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias, os quais compreendem antagonistas de NR 10 como ingredientes ativos. A presente invenção também se refere a métodos para prevenir ou tratar doenças inflamatórias, os quais usam antagonistas de NR 10.

Técnica Antecedente

[0002] Várias citocinas são conhecidas como fatores humorais envolvidos no crescimento e na diferenciação de vários tipos de células, ou na ativação de funções de células maduras diferenciadas. Células estimuladas por citocinas produzem tipos diferentes de citocinas, formando dessa maneira redes de múltiplas citocinas no corpo. A homeostase biológica é mantida por um balanço delicado da regulação mútua entre citocinas nessas redes. Acredita-se que várias doenças inflamatórias resultem de uma falha de tais redes de citocinas. Assim, a terapia anticitocina baseada em anticorpo monoclonal está atraindo muita atenção. Por exemplo, anticorpos anti-TNF e anticorpos antirreceptor de IL-6 demonstraram ser altamente eficazes clinicamente. Por outro lado, existem vários exemplos de falhas onde nenhum efeito terapêutico foi produzido quando uma citocina única, tal como IL-4, foi bloqueada sozinha, devido à ativação de vias compensatórias em condições patológicas reais.

[0003] Os presentes inventores tiveram sucesso no isolamento de um novo receptor de citocina NR 10, que era altamente homólogo a gp130, um receptor para transdução de sinal de IL-6 (Documento de

Patente 1). NR 10 forma um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR) e funciona como um receptor de IL-31 (Documento Não-Patente 1). Zymogenetics, Inc. relatou que camundongos transgênicos superexpressando IL-31 desenvolveram espontaneamente dermatite prurítica (Documento de Patente 2).

[0004] Entretanto, não pode ser afirmado que a expressão forçada de uma citocina em camundongos ou que um nível sanguíneo elevado de uma citocina em camundongos de um modelo patológico seja de fato a causa de uma doença. Não há informação se quaisquer efeitos terapêuticos são produzidos quando um sinal é bloqueado por um anticorpo. Por exemplo, a dermatite prurítica se desenvolve em camundongos transgênicos nos quais IL-18 é superexpressa em queratinócitos. Além disso, a concentração sanguínea de IL-18 se eleva com a progressão de condições patológicas em camundongos modelo NC/Nga para dermatite atópica espontânea. Baseado nos achados acima, a superexpressão de IL-18 foi prevista ser a causa da doença. Na realidade, entretanto, a administração de anticorpos neutralizantes não produziu efeitos terapêuticos (Documento Não-Patente 2).

[0005] Conforme descrito acima, a inibição da função de uma citocina não produz necessariamente efeitos terapêuticos em doenças nas quais o nível de expressão de uma citocina está elevado. A previsão de doenças nas quais os efeitos terapêuticos são de fato produzidos é difícil de fazer baseado no nível de expressão de uma citocina. Assim, é importante encontrar doenças nas quais a inibição da transdução de sinal de uma citocina-alvo realmente produza efeitos terapêuticos.

[0006] Documentos da técnica anterior da presente invenção estão descritos abaixo.

Documento de Patente 1: WO 00/75314

Documento de Patente 2: WO 03/060090

Documento Não-Patente 1: IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb; 117(2): 418-25

Documento Não-Patente 2: Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga, British Journal of Dermatology 149: 39-45, 2003.

Descrição da Invenção

Problemas a serem Solucionados pela Invenção

[0007] A presente invenção foi realizada considerando-se as circunstâncias descritas acima. Um objetivo da presente invenção é fornecer terapias anticitocinas baseadas em antagonista de receptor de citocina para doenças inflamatórias. Mais especificamente, o objetivo da presente invenção é descobrir doenças inflamatórias nas quais um efeito terapêutico pode ser obtido por anticorpos neutralizantes anti-NR 10 e fornecer novos métodos para tratar tais doenças. Outro objetivo da presente invenção é fornecer anticorpos neutralizantes anti-NR 10 humano que são clinicamente aplicáveis a seres humanos.

Meios para Solucionar os Problemas

[0008] Os presentes inventores conduziram estudos dedicados a solucionar os objetivos acima descritos. A presente invenção tentou avaliar a eficácia de fármaco de anticorpos neutralizantes anti-NR 10 de camundongo em modelos de camundongo para várias condições patológicas. Os resultados demonstraram que os anticorpos neutralizantes produziram o efeito de suprimir acentuadamente os sintomas em camundongos modelo de dermatite atópica usando camundongos NC/Nga e camundongos modelo para dermatite crônica, que foi desenvolvida pela aplicação repetida de cloreto de picrila. Isso

provou que anticorpos neutralizantes eram realmente úteis como um agente terapêutico. Além disso, foi demonstrado que os anticorpos produziam o efeito de supressão dos sintomas na artrite por colágeno, um modelo para reumatismo, e na artrite por colagenase, um modelo para osteoartrite. Estes resultados sugerem que o anticorpo neutralizante anti-NR 10 da presente invenção pode ser usado para prevenir ou tratar inflamação crônica. Os presentes inventores também foram bem sucedidos na obtenção de anticorpos neutralizantes para NR 10 humano. Especificamente, a presente invenção fornece:

1. um agente para prevenir ou tratar uma doença inflamatória, em que o agente compreende um antagonista de NR 10 como um ingrediente ativo;

2. o agente preventivo ou terapêutico de 1, em que o antagonista de NR 10 é um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10;

3. o agente preventivo ou terapêutico de 2, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

4. o agente preventivo ou terapêutico de 2, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal que tem atividade neutralizante de NR 10 humana;

5. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 2 a 4, em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

6. o agente preventivo ou terapêutico de 5, em que o anticorpo recombinante é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano;

7. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 2 a 6, em que o agente compreende como um ingrediente ativo um fragmento e/ou um fragmento modificado do anticorpo com atividade neutralizante de NR 10;

8. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 1

a 7, em que a doença inflamatória é dermatite atópica;

9. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 1 a 7, em que a doença inflamatória é dermatite crônica;

10. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 1 a 7, em que a doença inflamatória é reumatismo;

11. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de 1 a 7, em que a doença inflamatória é osteoartrite;

12. um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10;

13. o anticorpo de 12, que é um anticorpo monoclonal;

14. o anticorpo de 12, em que NR 10 é NR 10 humana;

15. o anticorpo de qualquer um de 12 a 14, que é um anticorpo recombinante;

16. o anticorpo de 15, em que o anticorpo recombinante é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano;

17. um fragmento e/ou um fragmento modificado do anticorpo de qualquer um de 12 a 16;

18. um método para prevenir ou tratar uma doença inflamatória, que compreende a etapa de administrar um antagonista de NR 10 a um paciente com uma doença inflamatória; e

19. uso de um antagonista de NR 10 para produzir um agente para prevenir ou tratar uma doença inflamatória.

Breve Descrição dos Desenhos

[0009] A figura 1 é um gráfico que mostra um resultado obtido pela observação do efeito de supressão do crescimento celular de BM095 adicionado a um sistema de ensaio de crescimento celular usando células Ba/F3 dependentes de IL-31. O eixo horizontal indica concentrações estimadas de mL-31 no sistema de ensaio e o eixo vertical indica as contagens celulares (OD_{450} (absorbância a 450 nm)). As quantidades adicionadas de BM095 (unidade: ng/ml) são

mostradas na legenda. Foi observado um efeito de supressão do crescimento celular dependente da quantidade adicionada de BM095.

[00010] A figura 2 é um gráfico que mostra um efeito terapêutico produzido quando anticorpos anti-NR 10 foram administrados a camundongos em um modelo de dermatite atópica. Um efeito supressor de inflamação significativo foi visto no grupo tratado com anticorpo anti-NR 10 quando comparado ao grupo de controle negativo (grupo-veículo).

[00011] A figura 3 é um gráfico que mostra uma alteração sequencial no peso corporal após anticorpos anti-NR 10 serem administrados a camundongos no modelo de dermatite atópica. A perda de peso foi observada no grupo tratado com um agente anti-inflamatório existente. Em contraste, nenhuma alteração de peso foi detectada no grupo tratado com anticorpo anti-NR 10. Assim, o anticorpo anti-NR 10 provou ser seguro.

[00012] A figura 4 é um gráfico que mostra um efeito terapêutico produzido quando anticorpos anti-NR 10 foram administrados a camundongos do modelo de dermatite crônica. Um efeito supressor de edema auricular significativo foi encontrado no grupo tratado com o anticorpo anti-NR 10.

[00013] A figura 5 é uma fotografia que mostra a coloração imunohistoquímica do pavilhão auricular de um camundongo do modelo de dermatite crônica. Como no caso de seres humanos, a expressão de NR 10 de camundongo foi vista estar aumentada na epiderme espessada.

[00014] A figura 6 é um gráfico que mostra um efeito supressor de artrite produzido quando anticorpos anti-NR 10 foram administrados a camundongos em um modelo de artrite induzida por colágeno.

[00015] A figura 7 é um gráfico que mostra o relacionamento entre a área sob a curva (AUC) e a concentração de BM095 administrado ao

modelo de artrite induzida por colagenase (osteoartrite). AUC significa a área sob a curva de transição da diferença entre os tamanhos das articulações dos joelhos direito e esquerdo definida como um valor que representa a o inchaço na articulação do joelho direito.

[00016] A figura 8 é um gráfico que mostra a correlação entre a concentração de anticorpos neutralizantes de NR 10 humano (anticorpo purificado) e a atividade de supressão do crescimento celular na presença de IL-31. Os anticorpos 1, 2 e 3 exibiram acentuada atividade neutralizante de NR 10.

[00017] A figura 9 é um gráfico que mostra a correlação entre a concentração de anticorpo quimérico NA633 contra NR 10 humano e a atividade de supressão do crescimento celular na presença de IL-31. NA633 exibiu acentuada atividade neutralizante de NR 10.

[00018] A figura 10 é um diagrama que compara as sequências de aminoácidos de NR 10 humano e NR 10 de um macaco cinomolgo. A sequência com sublinhado duplo indica a região transmembrana.

[00019] A figura 11 é um gráfico que mostra a atividade de supressão do crescimento celular do anticorpo quimérico NA633 na linhagem celular OSMR/BaF humana /NR 10 de macaco cinomolgo estimulada por IL-31 humana. NA633 também mostrou atividade neutralizante de NR 10 de macaco cinomolgo.

[00020] A figura 12 é um gráfico que mostra a transição de alteração percentual do peso corporal em camundongos do modelo de colite DSS.

[00021] A figura 13 é um gráfico que mostra a transição de alteração no espessamento do pavilhão auricular no modelo de dermatite de contato aguda usando cloreto de picrila.

Melhor Modo de Executar a Invenção

[00022] A presente invenção refere-se a agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias, que compreendem antagonistas de NR

10 como ingredientes ativos. A presente invenção é baseada na descoberta dos presentes inventores de que antagonistas de NR 10 (por exemplo, anticorpos que neutralizam NR 10) suprimem significativamente os sintomas em camundongos modelo com dermatite atópica, dermatite crônica, reumatismo, osteoartrite ou semelhantes.

[00023] NR 10 é uma proteína que forma um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR), e funciona como um receptor de IL-31. NR 10 também é conhecida por outros nomes, tais como glm-r (J Biol Chem 277, 16831-6, 2002), GPL (J Biol Chem 278, 49850-9, 2003), e IL-31RA (Nat Immunol 5, 752-60, 2004). A NR 10 da presente invenção inclui proteínas chamadas por tais nomes. A NR 10 da presente invenção também inclui NR 10 derivada de seres humanos, camundongos e outros mamíferos. NR 10 preferida inclui NR 10 derivada de seres humanos e de camundongos, mas não está limitada a estes. Há muitas variantes de união conhecidas de NR 10 derivada de humano (WO 00/075314). Das variantes de união descritas acima, NR 10.1 consiste em 662 aminoácidos e compreende um domínio transmembrana. NR 10.2 é uma proteína semelhante a um receptor solúvel que consiste em 252 aminoácidos sem o domínio transmembrana. Entretanto, variantes de união de NR 10 conhecidas que funcionam como proteínas de receptor transmembrana incluem NR 10.3 e IL-31RAv3. A NR 10 humana da presente invenção não é particularmente limitada, contanto que ela forme um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR) e funcione como um receptor de IL-31. NR 10 preferidas incluem NR 10.3 (também referida como ILRAv4 (Nat Immunol 5, 752-60, 2004)) e IL-31RAv3. NR 10.3 (IL-31RAv4) consiste em 662 aminoácidos (WO 00/075314; Nat Immunol 5, 752-60, 2004) e IL-31RAv3 consiste em 732 aminoácidos (Acesso no GenBank No: NM_139017). A sequência de aminoácido de IL-

31RAv4 é mostrada em SEQ ID NO: 6, e a sequência de aminoácido de IL-31RAv3 é mostrada em SEQ ID NO: 7. Entretanto, NR 10 derivada de camundongo inclui proteínas que compreendem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5.

[00024] Os antagonistas de NR 10 da presente invenção referem-se a substâncias que se ligam a NR 10 e bloqueiam a transdução de sinal intracelular baseada na ativação de NR 10, causando assim perda ou supressão das atividades fisiológicas das células. Neste documento, as atividades fisiológicas incluem, por exemplo, atividades de induzir ou suprimir a produção de substâncias fisiologicamente ativas (por exemplo, quimiocinas e citocinas inflamatórias), atividades de aumentar ou suprimir a secreção das substâncias, atividade de crescimento, atividade indutora de crescimento, atividade de sobrevivência, atividade de diferenciação, atividade indutora de diferenciação, atividade transcricional, atividade de transporte pela membrana, atividade de ligação, atividade proteolítica, atividade de fosforilação/defosforilação, atividade de redução da oxidação, atividade de transferência, atividade nucleolítica, atividade de desidratação, atividade indutora de morte celular, e atividade indutora de apoptose, mas não são limitadas a isto.

[00025] A presença de atividade de antagonista pode ser determinada por métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Por exemplo, os compostos de teste são colocados em contato com NR 10 expresso sobre a superfície das células na presença de um ligante, e é determinado se é a transdução de sinal intracelular, que é um indicador da ativação de NR 10, é ou não gerada. Tal determinação pode ser feita, por exemplo, pelo método descrito no documento "Dillon SR, et al., Interleukin 31, uma citocina produzida por células T ativadas, induz dermatite em camundongos. Nat Immunol. 2004 Jul; 5(7):752-60". Acredita-se que compostos que inibem a

transdução de sinal intracelular em resposta a estimulação do ligante sirvam como antagonistas de NR 10.

[00026] Os antagonistas da presente invenção podem ser compostos naturais ou artificiais. Compostos conhecidos podem ser usados como os antagonistas da presente invenção. Novos compostos determinados como tendo atividade de antagonista pelos métodos descritos acima também podem ser usados.

[00027] Em uma modalidade da presente invenção, os antagonistas de NR 10 incluem anticorpos que têm a atividade de neutralizar NR 10. Os "anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10" da presente invenção referem-se a anticorpos que têm a atividade de suprimir atividades fisiológicas baseadas em NR 10. Os "anticorpos que atividade neutralizante de NR 10" da presente invenção podem ser anticorpos policlonais ou monoclonais e, como uma modalidade preferida, inclui anticorpos monoclonais.

[00028] Tais anticorpos monoclonais que têm atividade neutralizante de NR 10 podem ser obtidos, por exemplo, pelo seguinte procedimento: anticorpos monoclonais anti-NR 10 são preparados pelo uso de um antígeno de NR 10 ou um fragmento deste que é derivado de um mamífero, tal como um humano ou um camundongo, por métodos conhecidos e, assim, os anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 são selecionados a partir dos anticorpos monoclonais anti-NR 10 assim obtidos. Especificamente, a imunização é obtida por métodos de imunização convencionais usando como um antígeno sensibilizante um antígeno desejado ou células que expressam o antígeno desejado. Anticorpos monoclonais anti-NR 10 podem ser preparados pela fusão de células imunes obtidas com células parentais conhecidas usando métodos de fusão celular convencional e examinando-as quanto a células que produzem anticorpos monoclonais (hibridomas) por métodos de rastreamento

convencionais. Animais a serem imunizados incluem, por exemplo, mamíferos, tais como camundongos, ratos, coelhos, carneiros, macacos, cabras, jumentos, vacas, cavalos e porcos. O antígeno pode ser preparado usando a sequência conhecida do gene de NR 10 de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, por métodos que usam baculovírus (por exemplo, WO 98/46777). Conforme descrito nos Exemplos aqui contidos abaixo, anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 podem ser selecionados, por exemplo, por testar o efeito de supressão de crescimento de uma linhagem celular dependente de IL-31 após o anticorpo candidato ser adicionado às células da linhagem celular dependente de IL-31. Anticorpos que suprimem o crescimento da linhagem celular dependente de IL-31 no método descrito acima são considerados como tendo atividade neutralizante de NR 10.

[00029] Hibridomas podem ser preparados, por exemplo, de acordo com o método de Milstein et al. (Kohler, G. & Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46) ou semelhantes. Quando a imunogenicidade de um antígeno é baixa, a imunização pode ser realizada após a ligação do antígeno com uma macromolécula que tem imunogenicidade, tal como albumina.

[00030] Em uma modalidade preferida da presente invenção, anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 incluem anticorpos monoclonais que têm a atividade de neutralizar NR 10 humana. Não há limitação particular sobre o imunógeno para preparar anticorpos monoclonais com a atividade de neutralizar NR 10 humana, desde que ele permita a preparação de anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 humana. Por exemplo, é conhecida a existência de múltiplas variantes de NR 10 humana. Qualquer uma das variantes pode ser usada como imunógeno, desde que ela permita a preparação de anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10

humano. Alternativamente, um fragmento de peptídeo de NR 10 ou uma sequência de NR 10 natural introduzida com mutações artificiais pode ser usada como o imunógeno sob as mesmas condições. NR 10.3 humano é um imunógeno preferido para preparar anticorpos da presente invenção com atividade neutralizante de NR 10.

[00031] Neste documento, os anticorpos da presente invenção descritos acima não são particularmente limitados, contanto que eles tenham atividade neutralizante de NR 10. Os anticorpos também incluem anticorpos recombinantes tais como anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos humanos. Os anticorpos quiméricos compreendem, por exemplo, as regiões constantes da cadeia pesada e leve de um anticorpo humano e as regiões variáveis da cadeia pesada e leve de um mamífero não humano, tal como um camundongo. Os anticorpos quiméricos podem ser produzidos por métodos conhecidos. Por exemplo, os anticorpos podem ser produzidos pela clonagem de um gene de anticorpo de hibridomas, inserindo-o num vetor apropriado e introduzindo o construto em hospedeiros (vide, por exemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado no Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Especificamente, cDNAs das regiões variáveis do anticorpo (regiões V) são sintetizados a partir de mRNA de hibridomas usando transcriptase reversa. Uma vez que os DNAs que codificam as regiões V de um anticorpo de interesse são obtidos, esses são ligados com DNAs que codificam as regiões constantes (regiões C) de um anticorpo humano desejado. Os construtos resultantes são inseridos em vetores de expressão. Alternativamente, os DNAs que codificam as regiões V do anticorpo podem ser inseridos em vetores de expressão que compreendem DNAs que codificam as regiões C de um anticorpo humano. Os DNAs são inseridos em vetores de expressão tal que eles

são expressos sob a regulação de regiões regulatórias de expressão, por exemplo, intensificadores e promotores. Na próxima etapa, as células hospedeiras podem ser transformadas com os vetores de expressão para permitir a expressão de anticorpos quiméricos.

[00032] Um anticorpo humanizado, que também é chamado de anticorpo humano transformado, é obtido pela transferência de uma região de determinação de complementaridade (CDR) de um anticorpo de um mamífero não-humano tal como um camundongo, com a CDR de um anticorpo humano. Técnicas convencionais de recombinação genética para a preparação de tais anticorpos também são conhecidas. Especificamente, uma sequência de DNA desenhada para ligar uma CDR de um anticorpo de camundongo com as regiões de estrutura (FRs) de um anticorpo humano é sintetizada por PCR, usando vários nucleotídeos construídos para compreender porções superpostas em suas terminações. Um anticorpo humanizado pode ser obtido por (1) ligação do DNA resultante a um DNA que codifica uma região constante de um anticorpo humano; (2) incorporação deste em um vetor de expressão; e (3) transfecção do vetor em um hospedeiro para produzir o anticorpo (vide Pedido de Patente Europeia Nº EP 239.400 e Publicação de Pedido de Patente Internacional Nº WO 96/02576). FRs de anticorpo humano que são ligadas através da CDR são selecionadas onde a CDR forme um sítio de ligação ao antígeno favorável. Conforme necessário, aminoácidos da região de estrutura de uma região variável de anticorpo podem ser substituídos tal que a CDR de um anticorpo humano remodelado forme um sítio de ligação ao antígeno apropriado (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

[00033] Métodos para obter anticorpos humanos também são conhecidos. Por exemplo, anticorpos humanos desejados com atividade de ligação de antígeno podem ser obtidos por (1) sensibilizar

linfócitos humanos com antígenos de interesse ou células que expressam antígenos de interesse in vitro; e (2) fundir os linfócitos sensibilizados com células de mieloma humano tais como U266 (vide a publicação Kokoku de pedido de patente Japonesa Nº (JP-B) H01-59878 (pedido de patente japonês examinado, aprovado publicado para oposição)). Alternativamente, o anticorpo humano desejado também pode ser obtido por usar um antígeno desejado para imunizar um animal transgênico que compreende um repertório completo de genes de anticorpo humano (vide o Pedido de Patente Internacional Nos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, e WO 96/33735).

[00034] Além disso, técnicas para se obter anticorpos humanos por seleção ("panning") com uma biblioteca de fagos de anticorpos humanos são conhecidas. Por exemplo, a região variável de um anticorpo humano é expressa como um anticorpo de cadeia única (scFv) sobre a superfície de um fago, usando um método de apresentação em fago, e os fagos que se ligam ao antígeno podem ser selecionados. Por analisar os genes de fagos selecionados, as sequências de DNA que codificam as regiões variáveis de anticorpos humanos que se ligam ao antígeno podem ser determinadas. Se as sequências de DNA de scFvs que se ligam ao antígeno forem identificadas, vetores de expressão apropriados que compreendem estas sequências podem ser construídos para se obter anticorpos humanos. Tais métodos são bem-conhecidos (vide WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, e WO 95/15388).

[00035] A sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve pode ser uma sequência de aminoácido com uma substituição, deleção, adição, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácido da região

variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve de um anticorpo que foi confirmado como tendo atividade neutralizante de NR 10, contanto que a atividade neutralizante de NR 10 seja mantida. Métodos bem-conhecidos daqueles versados na técnica para preparar a sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve do anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10, o qual compreende uma substituição, deleção, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou na região variável da cadeia leve, incluem métodos conhecidos para introduzir mutações em proteínas. Por exemplo, aqueles versados na técnica podem preparar mutantes funcionalmente equivalentes à região variável da cadeia pesada ou à região variável da cadeia leve do anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 por introduzir mutações apropriadas na sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve do anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 usando mutagênese sítio-dirigida (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, e Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, & Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, & Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492) ou similares. Desta foram, regiões variáveis da cadeia pesada ou regiões variáveis da cadeia leve

que compreendem mutações em um ou mais aminoácidos na região variável da cadeia peada ou na região variável da cadeia leve do anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 também estão incluídos na região variável da cadeia pesada ou na região variável da cadeia leve da presente invenção.

[00036] Quando um resíduo de aminoácido é alterado, o aminoácido é preferivelmente mutado por um aminoácido diferente que conserva as propriedades da cadeia lateral do aminoácido. Exemplos de propriedades de cadeia lateral de aminoácido são: aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, e V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, e T), aminoácidos que compreendem cadeias laterais alifáticas (G, A, V, L, I, e P), aminoácidos que compreendem cadeias laterais contendo grupos hidroxila (S, T, e Y), aminoácidos que compreendem cadeias laterais contendo enxofre (C e M), aminoácidos que compreendem cadeias laterais contendo amida e ácido carboxílico (D, N, E, e Q), aminoácidos que compreendem cadeias laterais básicas (R, K, e H), e aminoácidos que compreendem cadeias laterais aromáticas amino (H, F, Y, e W) (os aminoácidos são representados por códigos de uma letra entre parênteses). Substituições de aminoácido dentro de cada grupo são chamadas substituições conservativas. Já é sabido que um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido modificada na qual um ou mais resíduos de aminoácido em uma dada sequência de aminoácido são deletados, adicionados, e/ou substituídos por outros aminoácidos pode reter a atividade biológica original (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; (1984) 81:5662-6; Zoller, M. J. & Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10:6487-500; Wang, A. et al., Science (1984) 224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6409-13). Tais mutantes compreendem uma sequência de aminoácido que é pelo menos 70%

idêntica à sequência de aminoácido de uma região variável da cadeia pesada ou região variável da cadeia leve da presente invenção, mais preferivelmente pelo menos 75%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95% idêntica. Neste documento, identidade de sequência é definida como a porcentagem de resíduos idênticos àqueles na sequência de aminoácido original da região variável da cadeia pesada e o mais preferivelmente pelo menos 95% idêntica. Neste documento, a identidade de sequência é definida como a porcentagem de resíduos idênticos àqueles na sequência de aminoácido original da região variável da cadeia pesada ou na região variável da cadeia leve, determinado após as sequências serem alinhadas e intervalos terem sido apropriadamente introduzidos para maximizar a identidade de sequência conforme necessário. A identidade de sequências de aminoácido pode ser determinada pelo método descrito acima.

[00037] Alternativamente, uma sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou região variável da cadeia leve que compreende uma substituição, deleção, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve e que retém a atividade neutralizante de NR 10 pode ser obtida de ácido nucleico que hibridiza sob condições estridentes a ácido nucleico que compreende a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou região variável da cadeia leve. Condições de hibridização estridentes para isolar um ácido nucleico que hibridiza sob condições estridentes a um ácido nucleico que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve incluem, por exemplo, as condições de

ureia a 6M, SDS 0,4%, SSC 0,5x, e 37°C, ou condições de hibridização com estringências equivalentes a estas. Com condições mais estridentes, por exemplo, as condições de ureia a 6M, SDS 0,4%, SSC 0,1x, e 42°C isolamento de ácidos nucleicos com uma homologia muito maior pode ser esperada. As sequências dos ácidos nucleicos esperados pode ser determinada por métodos conhecidos descritos abaixo. A homologia global de sequência de nucleotídeos do ácido nucleico isolado é de pelo menos 50% ou identidade de sequência maior, preferivelmente 70% ou mais, mais preferivelmente 90% ou mais (por exemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais).

[00038] Um ácido nucleico que hibridiza sob condições estridentes a um ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve também pode ser isolado usando, ao invés dos métodos descritos acima, técnicas de hibridização, métodos de amplificação gênica usando iniciadores sintetizados com base na informação da sequência de nucleotídeo que codifica sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada e da região variável da cadeia leve, por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR).

[00039] Especificamente, a identidade de uma sequência de nucleotídeo ou sequência de aminoácido a outra pode ser determinada usando o algoritmo BLAST, por Karlin & Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 5873-7). Programas tais como BLASTN e BLASTX foram desenvolvidos com base neste algoritmo (Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-10). Para analisar as sequências de nucleotídeo de acordo com BLASTN baseado em BLAST, os parâmetros são ajustados, por exemplo, como score = 100 e comprimento de palavra = 12. Por outro lado, os parâmetros usados para a análise das sequências de aminoácido por BLASTX baseado em BLAST incluem,

por exemplo, $\text{escore} = 50$ e comprimento de palavra = 3. Parâmetros predeterminados para cada programa são usados quando se usa os programas BLAST e Gapped BLAST. Técnicas específicas para tais análises são conhecidos na técnica (vide o site da internet do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

[00040] Alternativamente, os anticorpos da presente invenção podem ser minicorpos. Tais minicorpos da presente invenção incluem fragmentos de anticorpo que não têm algumas porções de um anticorpo inteiro (por exemplo, IgG inteira), e não são particularmente limitados contanto que eles retenham a atividade neutralizante de NR 10. Os minicorpos da presente invenção não são particularmente limitados, contanto que eles sejam porções de anticorpos inteiros. Os minicorpos compreendem preferivelmente uma região variável da cadeia pesada (VH) ou região variável da cadeia leve (VL). Minicorpos particularmente preferidos compreendem tanto VH quanto VL.

[00041] Os minicorpos da presente invenção têm preferivelmente um peso molecular menor do que os anticorpos inteiros. Entretanto, os minicorpos podem formar multímeros, por exemplo, dímeros, trímeros, ou tetrâmeros, e assim seus pesos moleculares podem ser maiores do que aqueles dos anticorpos inteiros.

[00042] Os minicorpos da presente invenção incluem, por exemplo, anticorpos de scFv. Anticorpos de ScFv são polipeptídeos de cadeia única construídos por ligação de uma região variável da cadeia pesada ([VH]) e uma região variável da cadeia leve ([VL]) através de um ligante ou semelhante (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds., Resenburger & Moore, Springer Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315, (1994)). A ordem da região variável da cadeia pesada e da região variável da cadeia leve a serem ligadas

juntas não é particularmente limitada, e elas podem ser dispostas em qualquer ordem. Exemplos dos arranjos são listados abaixo.

[VH] ligante [VL]

[VL] ligante [VH]

[00043] A sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada ou da região variável da cadeia leve pode compreender uma substituição, deleção, adição e/ou inserção. Além disso, a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve também podem não ter algumas porções ou serem adicionadas com outros polipeptídeos, contanto que elas tenham habilidade de ligação de antígeno quando ligadas juntas. Alternativamente, as regiões variáveis podem ser quimerizadas ou humanizadas.

[00044] Na presente invenção, ligantes que se ligam à região variável do anticorpo compreendem ligantes de peptídeo arbitrários que podem ser introduzidos usando manipulação genética, ou ligantes sintéticos (por exemplo, ligantes descritos em "Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996").

[00045] Os ligantes preferidos na presente invenção são ligantes de peptídeo. Os comprimentos dos ligantes de peptídeo não são particularmente limitados e aqueles versados na técnica podem selecionar apropriadamente os comprimentos dependendo da finalidade. Comprimentos típicos são um a 100 aminoácidos, preferivelmente 3 a 50 aminoácidos, mais preferivelmente 5 a 30 aminoácidos, e particularmente preferivelmente 12 a 18 aminoácidos (por exemplo, 15 aminoácidos).

[00046] Sequências de aminoácido de tais ligantes de peptídeo incluem, por exemplo:

Ser

Gly·Ser

Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 8)

Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 9)

Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 10)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 11)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 12)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 13)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 14)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 15)

(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 10))_n

(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 11))_n

onde n é um número inteiro de 1 ou mais.

[00047] Ligantes sintéticos (agentes de reticulação química) incluem agentes de reticulação que são usados rotineiramente para reticular peptídeos, por exemplo, N-hidroxi succinimida (NHS), disuccinimidil suberato (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidil) (BS³), ditiobis(succinimidil propionato) (DSP), ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP), etileno glicol bis(succinimidil succinato) (EGS), etileno glicol bis(sulfosuccinimidil succinato) (sulfo-EGS), disuccinimidil tartrato (DST), disulfosuccinimidil tartrato (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxicarboniloxi)etil] sulfona (BSOCOES), e bis[2-(sulfosuccinimido-xicarboniloxi)etil] sulfona (sulfo-BSOCOES). Estes agentes reticuladores são disponíveis comercialmente.

[00048] Anticorpos da presente invenção incluem anticorpos nos quais dois ou mais resíduos de aminoácido foram adicionados à seqüência de aminoácido de um anticorpo da presente invenção. Adicionalmente, proteínas de fusão que resultam de uma fusão entre um dos anticorpos acima e um segundo peptídeo ou proteína estão incluídas na presente invenção. As proteínas de fusão podem ser preparadas por ligar um polinucleotídeo que codifica um anticorpo da

presente invenção e um polinucleotídeo que codifica um segundo peptídeo ou polipeptídeo em fase, inserindo-o em um vetor de expressão, e expressar o construto de fusão em um hospedeiro. Algumas técnicas conhecidas daqueles versados na técnica são disponíveis para esta finalidade. O peptídeo ou polipeptídeo parceiro a ser fundido com um anticorpo da presente invenção pode ser um peptídeo conhecido, por exemplo, FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology 6, 1204-1210 (1988)), 6x His que consiste em seis resíduos de His (histidina), 10x His, hemaglutinina de influenza (HA), fragmento de c-myc humano, fragmento de VSV-GP, fragmento de p18HIV, T7-tag, HSV-tag, E-tag, fragmento de antígeno T de SV40, Ick tag, fragmento de α -tubulina, B-tag, fragmento de Proteína C. Outros polipeptídeos parceiros a serem fundidos com os anticorpos da presente invenção incluem, por exemplo, GST (glutathione-S-transferase), HA (hemaglutinina de influenza), região constante de imunoglobulina, α -galactosidase, e MBP (proteína de ligação de maltose). Um polinucleotídeo que codifica um destes peptídeos ou polipeptídeos disponíveis comercialmente pode ser fundido com polinucleotídeo que codifica um anticorpo da presente invenção. O polipeptídeo de fusão pode ser preparado por expressar o construto de fusão.

[00049] Os anticorpos da presente invenção podem diferir na sequência de aminoácido, peso molecular, ponto isoelétrico, presença/ausência de cadeias de açúcar, e conformação dependendo da célula ou do hospedeiro que produz o anticorpo, ou do método de purificação. Entretanto, um anticorpo resultante está incluído na presente invenção, contanto que ele seja funcionalmente equivalente a um anticorpo da presente invenção. Por exemplo, quando um anticorpo da presente invenção é expresso em células procarióticas, por exemplo, *E. coli*, um resíduo de metionina é adicionado ao término

N da sequência de aminoácido do anticorpo original. Tais anticorpos estão incluídos na presente invenção.

[00050] O anticorpo da presente invenção pode ser preparado por métodos conhecidos daqueles versados na técnica. O anticorpo pode ser preparado, por exemplo, por técnicas de recombinação genética conhecidas daqueles versados na técnica com base na sequência de um anticorpo que reconhece NR 10. Especificamente, tal anticorpo pode ser preparado por construir um polinucleotídeo que codifica um anticorpo baseado na sequência de um anticorpo que reconhece NR 10, inserir o construto em um vetor de expressão, e então expressá-lo em células hospedeiras apropriadas (vide, por exemplo, Co, M. S. *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. & Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. & Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137).

[00051] Os vetores incluem vetores M13, vetores, PUC, vetores pBR322, pBluescript, e pCR-Script. Alternativamente, quando se pretende subclonar e cortar cDNA, os vetores incluem, por exemplo, pGEM-T, pDIRECT, e pT7, além dos vetores descritos acima. Vetores de expressão são particularmente úteis quando se usa vetores para produzir os anticorpos da presente invenção. Por exemplo, quando se pretende expressão em *E. coli* tal como JM109, DH5 α , HB101, e XL1-Blue, os vetores de expressão não apenas têm as características descritas acima que permitem a amplificação do vetor em *E. coli*, mas também devem carregar um promotor que permite a expressão eficaz em *E. coli*, por exemplo, o promotor de lacZ (Ward *et al.*, *Nature* (1989) 341, 544-546; *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427), o promotor de araB (Better *et al.*, *Science* (1988) 240, 1041-1043), o promotor de T7 ou

semelhantes. Tais vetores incluem pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Quiagen), pEGFP, ou pET (neste caso, o hospedeiro é preferivelmente BL21 que expressa RNA polimerase de T7) além dos vetores descritos acima.

[00052] Os vetores podem compreender sequências de sinal para a secreção de anticorpo, como uma sequência de sinal para a secreção de anticorpo, uma sequência de sinal de pelB (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) pode ser usada quando uma proteína é secretada no periplasma de E. coli. O vetor pode ser introduzido nas células hospedeiras por cloreto de cálcio ou métodos de eletroporação, por exemplo.

[00053] Além dos vetores para E. coli, os vetores para produzir os anticorpos da presente invenção incluem vetores de expressão de mamífero (por exemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322), pEF, e pCDM8), vetores de expressão derivados de células de inseto (por exemplo, o "sistema de expressão de baculovírus Bac-to-BAC" (Gibco-BRL) e pBacPAK8), vetores de expressão derivados de plantas (por exemplo, pMH1 e pMH2), vetores de expressão derivados de vírus de animais (por exemplo, pHSV, pMV, e pAdexLcw), vetores de expressão retrovirais (por exemplo, pZIPneo), vetores de expressão de levedura (por exemplo, o kit de expressão "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, e SP-Q01), e vetores de expressão de Bacillus subtilis (por exemplo, pPL608 e pKTH50), por exemplo.

[00054] Quando se pretende a expressão em células de animais, tais como células CHO, COS, e NIH3T3, os vetores devem ter um promotor essencial para expressão em células, por exemplo, promotor de SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), promotor de MMLV-LTR, promotor de EF1 α (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), e promotor de CMV, e mais preferivelmente eles têm um

gene para selecionar células transformadas (por exemplo, um gene de resistência a fármacos que permite a avaliação usando um agente (neomicina, G418, ou semelhantes). Vetores com tais características incluem pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, e pOP13, por exemplo.

[00055] Além disso, o método a seguir pode ser usado para expressão gênica estável e amplificação gênica em células: células CHO deficientes em uma via de síntese de ácido nucleico são introduzidas com um vetor (por exemplo, pSV2-dhfr (Molecular Cloning 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)) que carrega um gene de DHFR que compensa a deficiência, e o vetor é amplificado usando metotrexato (MTX). Alternativamente, o método a seguir pode ser usado para expressão gênica transitória: células COS com um gene que expressa um antígeno T de SV40 no seu cromossomo são transformadas com um vetor (pcD e semelhantes) com uma origem de replicação de SV40. Origens de replicação derivadas de poliovírus, adenovírus, vírus do papiloma bovino (BPV), e semelhantes também podem ser usados. Para amplificar o número de cópias do gene em células hospedeiras, os vetores de expressão podem ainda carregar marcadores de seleção tais como gene de aminoglicosídeo transferase (APH), gene da timidina quinase (TK), gene da xantina-guanina fosforribosiltransferase de *E. coli* (Ecogpt), e gene da di-hidrofolato redutase (dhfr).

[00056] Anticorpos desejados obtidos pelos métodos descritos acima podem ser isolados de dentro das células hospedeiras ou de fora das células (do meio, ou semelhantes), e purificadas para homogeneidade. Os anticorpos podem ser isolados e purificados por métodos usados rotineiramente para isolar e purificar anticorpos, e o tipo de método não é limitado. Por exemplo, os anticorpos podem ser isolados e purificados por selecionar e combinar apropriadamente

cromatografia de coluna, filtração, ultrafiltração, precipitação por "salting out", precipitação por solvente, extração com solvente, destilação, imunoprecipitação, eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, isoeletrofocalização, diálise, recristalização, e semelhantes.

[00057] As cromatografias incluem, por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca de íon, cromatografia hidrofóbica, filtração em gel, cromatografia de fase reversa, e cromatografia de adsorção (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Os métodos cromatográficos descritos acima podem ser conduzidos usando cromatografia líquida, por exemplo, HPLC e FPLC. As colunas que podem ser usadas para cromatografia de afinidade incluem colunas de proteína A e colunas de proteína G. Colunas que usam proteína A incluem, por exemplo, Hyper D, POROS, e Sepharose FF (GE Amersham Biosciences). A presente invenção compreende anticorpos que são altamente purificados usando estes métodos de purificação.

[00058] A presente invenção também fornece agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias, as quais compreendem como ingredientes ativos fragmentos e/ou produtos de modificação de um anticorpo da presente invenção. Os fragmentos e/ou produtos de modificação de anticorpos da presente invenção incluem fragmentos de anticorpo que não têm algumas porções dos anticorpos da presente invenção (anticorpos inteiros (por exemplo, IgG inteira), anticorpos recombinantes (por exemplo, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, e anticorpos humanos) e minicorpos (por exemplo, anticorpos de scFv)), e não são particularmente limitados contanto que eles retenham a habilidade de se ligar aos seus antígenos. Os fragmentos de anticorpo da presente invenção não são particularmente limitados, contanto que eles sejam porções de

anticorpos inteiros. Os fragmentos compreendem preferivelmente uma região variável da cadeia pesada (VH) e/ou uma região variável da cadeia leve (VL). A sequência de aminoácido da VH ou VL pode compreender substituições, deleções, adições e/ou inserções. A VH e/ou VL pode não ter algumas porções, contanto que a habilidade de se ligar ao antígeno seja retida. Além disso, a região variável pode ser quimerizada ou humanizada. Especificamente, fragmentos de anticorpo incluem, por exemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv. Tais fragmentos de anticorpo podem ser obtidos por construir genes que codificam os fragmentos de anticorpo, introduzi-los em vetores de expressão, e então expressá-los em células hospedeiras apropriadas (vide, por exemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. & Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. & Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

[00059] Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos conjugados que são ligados a qualquer uma de várias moléculas, tais como polietileno glicol (PEG), substâncias radioativas, substâncias fluorescentes, substâncias quimioluminescentes, enzimas e toxinas. Tais anticorpos conjugados podem ser obtidos por modificar quimicamente os anticorpos obtidos. Métodos para modificar anticorpos foram estabelecidos neste campo (por exemplo, US 5057313 e US 5156840). Os "anticorpos" da presente invenção também incluem tais anticorpos conjugados.

[00060] A atividade do anticorpo de se ligar a NR 10 pode ser determinada por métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Métodos para determinar a atividade de ligação do antígeno de um anticorpo incluem, por exemplo, ELISA (ensaio imunoabsorvente

ligado a enzima), EIA (imunoensaio enzimático), RIA (radioimunoensaio), e método de anticorpo fluorescente. Por exemplo, quando o imunoensaio enzimático é usado, amostras contendo anticorpo, tais como anticorpos purificados e sobrenadantes de cultura de células produtoras de anticorpo, são adicionadas a placas revestidas com antígeno. Um anticorpo secundário marcado com uma enzima, tal como fosfatase alcalina, é adicionado e as placas são incubadas. Após lavagem, um substrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenila, é adicionado e a absorvância é medida para avaliar a atividade de ligação ao antígeno.

[00061] Além disso, a atividade neutralizante de NR 10 de um anticorpo pode ser determinada, por exemplo, pelo método descrito nos Exemplos, o qual envolve testar o efeito de suprimir o crescimento da linhagem celular dependente de IL-31.

[00062] Os antagonistas de NR 10 ou anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 da presente invenção podem ser usados nos agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias. Os presentes inventores provaram que a administração de anticorpos neutralizantes de NR 10 de camundongo produziu efeitos terapêuticos acentuados em animais modelo para várias doenças inflamatórias. Além disso, a expressão de NR 10 humana foi relatada estando aumentada na epiderme espessada de pacientes com dermatite atópica (Documento não-patente 1). Os presentes inventores confirmaram por coloração imuno-histoquímica que no caso de seres humanos, a expressão de NR 10 de camundongo estava aumentada na epiderme espessada de pavilhões auriculares nos camundongos do modelo de dermatite crônica descritos acima (Exemplo 5). Estes achados sugerem que NR 10 está envolvida similarmente em doenças inflamatórias em todas as espécies de animais, e que, assim como anticorpos neutralizantes de NR 10 de camundongo, anticorpos que neutralizam NR 10 humana

são eficazes em prevenir e tratar várias doenças inflamatórias. Além disso, assim como com os achados descritos neste Exemplo, também é esperado que antagonistas de NR 10 que não anticorpos também tenham efeitos terapêuticos sobre várias doenças inflamatórias.

[00063] Na presente invenção, doença inflamatória se refere a doenças com características patológicas envolvidas em reações citológicas e histológicas que ocorrem em vasos sanguíneos afetados e tecidos adjacentes em resposta a uma injúria ou estimulação anormal causada por agentes físicos, químicos ou biológicos (Stedman's Medical Dictionary, 5ª Ed., MEDICAL VIEW CO., 2005). Geralmente, doenças inflamatórias incluem dermatite (dermatite atópica, dermatite crônica, e semelhantes), doenças inflamatórias do intestino (colite e semelhantes), asma, artrite, (artrite reumatoide, osteoartrite e semelhantes), bronquite, doenças autoimunes de Th2, lúpus eritematoso sistêmico, miastenia gravis, GVHD crônico, doença de Crohn, espondilite deformante, dor lombar, gota, inflamação após cirurgia ou injúria, inchaço, neuralgia, laringofaringite, cistite, hepatite, (esteato-hepatite não-alcoólica, hepatite alcoólica, e semelhantes), hepatite B, hepatite C e arteriosclerose.

[00064] Exemplos preferidos de doenças inflamatórias que são objetos da presente invenção incluem dermatite atópica, dermatite crônica, reumatismo, osteoartrite, e asma crônica.

[00065] Os presentes inventores descobriram que anticorpos antagonistas de NR 10 têm efeitos terapêuticos contra dermatite atópica, dermatite crônica, reumatismo, e osteoartrite. Por outro lado, foi revelado que anticorpos antagonistas de NR 10 não produzem efeitos terapêuticos na dermatite de contato aguda, e em modelos de colite aguda por DSS.

[00066] Os agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias da presente invenção compreendem como um ingrediente ativo um

antagonista de NR 10 ou um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 descrito acima. A expressão "compreende um antagonista de NR 10 como um ingrediente ativo" significa compreendendo um antagonista de NR 10 como pelo menos um dos ingredientes ativos, e não limita os conteúdos. Além disso, os agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias da presente invenção podem compreender também, em combinação com um antagonista de NR 10, outros ingredientes que aumentam a prevenção ou tratamento da doença inflamatória.

[00067] O antagonista de NR 10 da presente invenção pode ser formulado de acordo com métodos usuais (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edição, Mark Publishing Company, Easton, EUA). Além disso, eles podem compreender veículos e/ou aditivos farmacologicamente aceitáveis se necessário. Por exemplo, eles podem conter tensoativos (por exemplo, PEG e Tween), excipientes, antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico), agentes corantes, agentes flavorizantes, conservantes, estabilizantes, agentes tamponantes (por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, e outros ácidos orgânicos), agentes quelantes (por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, e outros ácidos orgânicos), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), agentes de suspensão, agentes isotonzantes, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes, promotores de fluidez, e corretores (corrigents). Entretanto, os veículos que podem estar compreendidos nos agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias da presente invenção não são limitados a esta lista. De fato, outros veículos comumente usados tais como ácido salicílico anidro fraco, lactose, celulose cristalina, manitol, amido, carmelose de cálcio, carmelose de sódio, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, polivinilacetaldietilaminoacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicerídeo de ácido graxo de cadeia

média, óleo de rícino polioxietileno hidrogenado 60, sacarose, carboximetilcelulose, amido de milho, sal inorgânico, e etc. podem ser compreendidos apropriadamente. As composições também podem compreender outros polipeptídeos de baixo peso molecular, proteínas tais como albumina sérica, gelatina, e imunoglobulina, e aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina, e lisina. Quando a composição é preparada como uma solução aquosa para injeção, antagonistas de NR 10 podem ser dissolvidos em uma solução isotônica que compreende, por exemplo, solução salina fisiológica, dextrose, e outros adjuvantes. Os adjuvantes podem incluir, por exemplo, D-sorbitol, D-manose, D-manitol, e cloreto de sódio. Além disso, agentes solubilizantes apropriados, por exemplo, alcoóis (por exemplo, etanol), polialcoóis (por exemplo, propileno glicóis e PEGs), e detergentes não-iônicos (polissorbato 80 e HCO-50) podem ser usados concomitantemente.

[00068] Se necessário, antagonistas de NR 10 podem ser encapsulados em microcápsulas feitas de hidroxixelulose, gelatina, polimetilmetacrilato, e similares), e transformadas em componentes de sistemas de liberação de fármacos coloidais (lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas, e nano-cápsulas) (por exemplo, vide "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edição" &, Oslo Ed. (1980)). Além disso, métodos para fazer fármacos de liberação sustentada são conhecidos, e estes podem aplicados para antagonistas de NR 10 (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; Patente US Nº 3,773,919; Pedido de Patente Europeu (EP) Nº 58,481; Sidman et al., Biopolímeros (1983) 22, 547-56; EP 133.988).

[00069] Os agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias da presente invenção podem ser administrados oralmente ou parenteralmente, mas são preferivelmente administrados

parenteralmente. Especificamente, os agentes são administrados aos pacientes por injeção, ou administração percutânea. Injeções incluem, por exemplo, injeções intravenosas, injeções intramusculares, e injeções subcutâneas, para administração sistêmica ou local. Os agentes podem ser dados a locais onde a inflamação deve ser suprimida, ou áreas circundando os locais por infusão local, injeção intramuscular em particular. Os métodos de administração podem ser apropriadamente selecionados de acordo com a idade e condição do paciente. A dose de administração única pode ser selecionada, por exemplo, de dentro da faixa de 0,0001 a 100 mg do ingrediente ativo por kg de peso corporal. Alternativamente, quando os agentes são administrados a pacientes seres humanos, a dose o ingrediente ativo pode ser selecionada de dentro da faixa de 0,001 a 1.000 mg/kg de peso corporal. A administração em dose única compreende preferivelmente, por exemplo, antagonista de NR 10 em cerca de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal. Entretanto, a dose de um agente para prevenir ou tratar doenças inflamatórias da presente invenção não está limitada a estes exemplos.

[00070] A presente invenção também fornece anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 (incluindo fragmentos de anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10, e/ou produtos de modificação destes; a mesma definição é usada por toda a descrição abaixo). Os anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 da presente invenção são úteis como ingredientes ativos nos agentes descritos acima para prevenir ou tratar doenças inflamatórias. Os anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 da presente invenção podem ser anticorpos policlonais ou monoclonais, mas são preferivelmente anticorpos monoclonais. Tais anticorpos monoclonais que têm atividade neutralizante de NR 10 podem ser obtidos pelos métodos descritos acima. Os anticorpos monoclonais da presente

invenção têm a atividade de neutralizar NR 10 derivado de mamíferos ou fragmentos destes, preferivelmente têm a atividade de neutralizar NR 10 derivado de seres humanos ou camundongos, ou fragmentos destes, e mais preferivelmente a atividade de NR 10 derivado de seres humanos ou fragmentos destes. NR 10 de humano ou um fragmento de peptídeo deste pode ser usado como um imunógeno para preparar anticorpos monoclonais que têm a atividade de neutralizar NR 10 humano. Alternativamente, os anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 da presente invenção podem ser anticorpos recombinantes. Anticorpos recombinantes que têm atividade neutralizante de NR 10 da presente invenção incluem, mas não são limitados, a anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos humanos, e minicorpos.

[00071] Na presente invenção, os anticorpos que têm atividade neutralizante de NR 10 incluem, por exemplo, anticorpos anti-NR 10 de camundongo que compreendem uma região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e uma região variável da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 3.

[00072] A presente invenção também inclui anticorpos monoclonais que têm a atividade de neutralização de NR 10 humano. Os anticorpos monoclonais que têm atividade de neutralizar NR 10 humano da presente invenção podem ser obtidos por preparar anticorpos monoclonais usando NR 10 humana ou um fragmento de peptídeo desta como um imunógeno, e então selecionar a partir dos anticorpos monoclonais anti-NR 10 de humano, anticorpos que tenham a atividade de neutralizar NR 10 humana, com base no sistema de ensaio descrito acima usando a linhagem celular dependente de IL-31.

[00073] Na presente invenção, os anticorpos que têm atividade de neutralizar NR 10 humana incluem os anticorpos descritos em

qualquer um de:

(a) anticorpos que têm uma região variável da cadeia pesada que compreende CDR1, CDR2, e CDR3 que consistem nas sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 18, 19, e 20, respectivamente.

(b) anticorpos que têm a região variável da cadeia leve que compreende CDR1, CDR2, e CDR3 que consistem nas sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 21, 22, e 23, respectivamente;

(c) anticorpos que têm a região variável da cadeia pesada de (a) e a região variável da cadeia leve de (b); e

(d) anticorpos que reconhecem o mesmo epítipo reconhecido pelos anticorpos de qualquer um de (a) a (c).

[00074] Se um anticorpo reconhece o mesmo epítipo que aquele reconhecido por outro anticorpo pode ser confirmado pela competição entre os dois anticorpos contra o epítipo. A competição entre os anticorpos pode ser avaliada por ensaios de ligação competitiva usando meios tais como ELISA, método de transferência de energia (FRET), e tecnologia de ensaio de microvolume fluorimétrico (FMAT(R)). A quantidade dos anticorpos ligados a um antígeno se correlaciona indiretamente com a habilidade de ligação de anticorpos competidores candidatos (anticorpos de teste) que se ligam competitivamente ao mesmo epítipo. Em outras palavras, conforme a quantidade ou a afinidade dos anticorpos de teste ao mesmo epítipo aumenta, a quantidade de anticorpos ligados ao antígeno diminui, e a quantidade de anticorpos de teste ligados ao antígeno aumenta. Especificamente, anticorpos apropriadamente marcados e anticorpos a serem avaliados são adicionados simultaneamente aos antígenos, e assim os anticorpos ligados são detectados usando o marcador. A quantidade de anticorpos ligados ao antígeno pode ser facilmente determinada por marcar os anticorpos antecipadamente. Este

marcador não é particularmente limitado, e o método de marcação é selecionado de acordo com a técnica de ensaio usada. O método de marcação inclui marcação fluorescente, radiomarcção, marcação enzimática, e semelhantes.

[00075] Por exemplo, anticorpos marcados fluorescentemente e anticorpos não marcados ou anticorpos de teste são adicionados simultaneamente a células animais que expressam NR 10, e os anticorpos marcados são detectados por tecnologia de ensaio de microvolume fluorimétrico.

[00076] IC50 é a concentração na qual a quantidade de anticorpos marcados ao epítipo é reduzida para 50% pela ligação de anticorpos não-marcados. Neste documento, anticorpos que reconhecem o mesmo epítipo são anticorpos que podem reduzir a quantidade de anticorpos marcados ao epítipo para pelo menos 50% quando a concentração dos anticorpos de teste é dez vezes maior do que a IC50 dos anticorpos não-marcados.

[00077] Anticorpos que têm a atividade de neutralizar NR 10 humana que são usados na presente invenção preferivelmente têm ainda atividade de ligação a NR 10 de macaco cinomolgo, e mais preferivelmente têm a atividade de neutralizar NR 10 de macaco cinomolgo. A NR 10 de macaco cinomolgo que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 pode ser usada em medidas da atividade de neutralização ou ligação a NR 10 de macaco cinomolgo.

[00078] A presente invenção também fornece os métodos terapêuticos descritos abaixo. A interpretação de NR 10, antagonistas, anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, doenças inflamatórias, e outros nos métodos são descritas acima.

(1) um método para prevenir ou tratar uma doença inflamatória, o qual compreende a etapa de administrar um antagonista

de NR 10 a um paciente com uma doença inflamatória;

(2) o método de (1), no qual o antagonista de NR 10 é um anticorpo que tem a atividade de se ligar a NR 10;

(3) o método de (2), no qual o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

(4) o método de (2), no qual o anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga a NR 10 humana;

(5) o método de qualquer um de (2) a (4), no qual o anticorpo é um anticorpo recombinante;

(6) o método de (5), no qual o anticorpo recombinante é um anticorpo quimérico, anticorpo humanizado ou anticorpo humano;

(7) o método de qualquer um de (2) a (6), no qual um fragmento de um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 e/ou um produto modificado deste estão incluídos como um ingrediente ativo;

(8) o método de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é dermatite atópica;

(9) o método de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é dermatite crônica;

(10) o método de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é reumatismo; e

(11) o método de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é osteoartrite.

[00079] A presente invenção também fornece as invenções descritas abaixo. A explicação de NR 10, antagonistas, anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, doenças inflamatórias e outros nos métodos são descritas acima..

(1) uso de um antagonista de NR 10 para produzir um agente para prevenir ou tratar uma doença inflamatória;

(2) o uso de (1), no qual o antagonista de NR 10 é um

anticorpo que tem a atividade de se ligar a NR 10;

(3) o uso de (2), no qual o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

(4) o uso de (2), no qual o anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga a NR 10 humana;

(5) o uso de qualquer um de (2) a (4), no qual o anticorpo é um anticorpo recombinante;

(6) o uso de (5), no qual o anticorpo recombinante é um anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, ou anticorpo humano;

(7) o uso de qualquer um de (2) a (6), no qual um fragmento de um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10 e/ou um produto de modificação deste são incluídos como um ingrediente ativo;

(8) o uso de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é dermatite atópica;

(9) o uso de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é dermatite crônica;

(10) o uso de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é reumatismo; e

(11) o uso de qualquer um de (1) a (7), no qual a doença inflamatória é osteoartrite.

[00080] Todos os documentos da técnica anterior citados aqui estão incorporados por referência neste documento.

Exemplos

[00081] Neste documento abaixo, a presente invenção será descrita especificamente com relação aos Exemplos, mas não deve ser interpretada como sendo limitada a isto.

Exemplo 1: estabelecimento da linhagem celular Ba/F3 que expressa NR 10 e OSMR

[00082] Um cDNA de NR 10 humana (SEQ ID NO: 1 de WO 0075314) foi inserido no vetor de expressão pCOS1 (Biochem Biophys

Res Commun. 228, p838-45, 1996) para produzir pCosNR 10.3. Um cDNA de receptor de oncostatina M (OSMR, Nº de Acesso GenBank NM003999) foi isolado de uma biblioteca placentária humana por PCR e então o vetor de expressão pCos1-hOSMR foi similarmente construído. Por eletroporação, 10 µg de cada um dos vetores foram simultaneamente introduzidos em células da linhagem celular Ba/F3 derivada de células pro-B dependentes de IL-3 de camundongo (BioRad Gene Pulser; 960 µF e 0,33 kV). Após a introdução, IL-31 humana foi adicionada e as células foram cultivadas. Assim, uma linhagem celular que proliferou de uma forma dependente de IL-31 foi obtida. Da mesma maneira, uma linhagem celular dependente de IL-31 de camundongo também foi preparada a partir de células Ba/F3 que foram feitas para expressar os genes de NR 10 e OSMR de camundongo.

[00083] Em ambas as linhagens celulares, a ED50 foi encontrada ser de vários ng/ml. Assim, linhagens celulares bem proliferativas foram obtidas. A linhagem celular humana dependente de IL-31 não exibiu resposta a IL-31 de camundongo e o crescimento foi suprimido mediante a adição de proteína NR 10 humana (domínio extracelular). A linhagem celular dependente de IL-31 de camundongo não exibiu resposta a IL-31 humana e o crescimento não foi suprimido pela proteína NR 10 de camundongo adicionada (domínio extracelular).

Exemplo 2: preparação de proteína NR 10 (domínio extracelular)

[00084] O domínio extracelular sozinho foi amplificado por PCR usando cDNA de NR 10 como um modelo, uma sequência de FLAG tag foi ligada ao término C e foi inserida no vetor de expressão pCXND3 (WO 2005/005636) (pCXND3-NR 10-flag). 10 µg desse vetor linear foram introduzidos em células da linhagem celular DG44 de ovário de hamster chinês por eletroporação (BioRad Gene PulserII; 25 µF e 1,5 kV). Uma linhagem celular com alta expressão foi obtida.

Uma amostra purificada foi preparada a partir de um sobrenadante de uma cultura em larga escala da linhagem celular por coluna de anticorpo anti-FLAG (SIGMA) e filtração em gel e usada nos experimentos descritos abaixo. NR 10 de camundongo (domínio extracelular) com sequência FLAG tag ligada ao término C foi similarmente preparada.

Exemplo 3: isolamento de scFv que tem atividade neutralizante anti-NR 10 de camundongo e preparação de BM095 como uma IgG quimerizada

[00085] Especificamente, os presentes inventores tentaram limitar os clones candidatos a partir de uma biblioteca de fago de anticorpo humano por seleção (panning) usando proteína NR 10 biotilada de camundongo (domínio extracelular). ScFv secretório foi purificado a partir dos clones e adicionado a um sistema de ensaio de crescimento celular usando células Ba/F3 dependentes de IL-31 descritas no exemplo 1. Como resultado, o clone BM095 que exibe forte atividade supressora de crescimento foi obtido com sucesso.

[00086] Usando PCR, a sequência da região variável da cadeia H humana (VH) de BM095 foi ligada a região constante (após CH1) de IgG2a de camundongo e a sequência da região variável da cadeia L humana (VL) de BM095 foi ligada à região constante da cadeia λ de camundongo, para construir um vetor de expressão. A sequência de aminoácidos de VH é mostrada em SEQ ID NO:1 e a sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos é mostrada em SEQ ID NO:2. A sequência de aminoácidos de VL é mostrada em SEQ ID NO:3 e a sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos é mostrada em SEQ ID NO:4. Os vetores de expressão lineares respectivos foram introduzidos simultaneamente na linhagem celular DG44 e então uma linhagem celular expressando IgG quimerizada em um nível alto foi selecionada. Uma amostra purificada

foi obtida do sobrenadante de uma cultura em larga escala dessa linhagem celular usando uma coluna de proteína A (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences) e cromatografia de coluna por troca de cátion (SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH). Além disso, pirogênio foi removido usando resina ActiClean Etox (Sterogen) para reduzir a concentração abaixo do limite de detecção. A amostra foi usada nos experimentos com animais descritos abaixo. O resultado obtido pela adição de BM095 ao sistema de ensaio descrito acima é mostrado na figura 1.

Exemplo 4: avaliação da eficácia de fármaco em um modelo de dermatite atópica usando camundongos NC/Nga

[00087] Um modelo de dermatite foi produzido pela aplicação repetida de cloreto de picrila (PiCl) em intervalos semanais. Especificamente, 4 dias após a sensibilização com PiCl a 5% (150 µl) no abdômen e pata, a indução de dermatite foi obtida pela aplicação repetida de PiCl a 0,8% (150 µl) sobre o dorso e pavilhão auricular em intervalos semanais. Os sintomas resultantes foram observados duas vezes por semana além do terceiro ao sexto período semanal e cinco ocorrências ((1) prurido, (2) vermelhidão e sangramento, (3) edema, (4) injúria e dano tecidual e (5) incrustação e ressecamento) foram pontuados independentemente em uma escala de 0 a 3. O anticorpo foi administrado a 10 mg/kg nas cavidades peritoneais no dia antes da sensibilização e a cada indução, 6 vezes no total (grupo de BM095) ou no dia anterior a cada indução após a terceira semana, três vezes no total (grupo V/B). Como controle positivo, 1 mg/kg de dexametasona foi administrado oralmente todos os dias após a terceira semana (grupo DEX). Cada grupo continha 10 camundongos machos NC/Nga.

[00088] Como mostrado na figura 2, um efeito supressor significativo foi encontrado no grupo tratado com anticorpo quando comparado ao grupo administrado com veículo-solvente. Além disso,

como visto na figura 2, embora tenha sido vista perda de peso significativa no grupo DEX, não houve alteração de peso no grupo administrado com anticorpo. Isso sugere que o anticorpo é um agente muito seguro.

Exemplo 5: avaliação de eficácia de fármaco usando um modelo de dermatite crônica criado por aplicação repetida de cloreto de picrila

[00089] Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram sensibilizados pela aplicação de 20 µl de cloreto de picrila a 0,5% (solução de acetona/óleo de oliva (1:4 v/v) sobre suas orelhas direitas. A indução foi obtida pela aplicação repetida de 20 µl de cloreto de picrila 0,25% (acetona/óleo de oliva (1:4 v/v)) sobre suas orelhas direitas a cada dois dias desde o oitavo dia após a sensibilização. 10 mg/kg de BM095 foram administrados nas cavidades peritoneais uma vez por semana desde o dia anterior à sensibilização no grupo para avaliação do efeito preventivo de BM095 ou desde o 20º dia após o início da indução no grupo para avaliação do efeito terapêutico de BM095. O edema do pavilhão auricular foi avaliado medindo sequencialmente a espessura da orelha direita usando um calibrador de espessura.

[00090] Como resultado, um efeito supressor significativo foi encontrado no grupo administrado com anticorpo, como visto na figura 4. A expressão de NR 10 humana foi relatada estar aumentada na epiderme espessada de pacientes com dermatite atópica (Documento Não-Patente 1). Pavilhões auriculares dos camundongos do modelo de dermatite crônica descritos acima foram corados imuno-histoquimicamente. Como no caso de seres humanos, a expressão de NR 10 de camundongo foi observada estar aumentada na epiderme espessada (figura 5; BM095 no qual a região constante foi substituída por aquela de IgG humana foi preparado no exemplo 3 e usado na coloração imuno-histoquímica. Porções coradas em marrom são sítios

de expressão de NR 10). Esses achados sugerem que NR 10 está similarmente envolvida nas doenças inflamatórias em humanos e em camundongos.

Exemplo 6: avaliação de eficácia de fármacos usando modelo de artrite induzida por colágeno (reumatismo)

[00091] Preparação de camundongos modelo e avaliação da eficácia de fármacos foram obtidas pelo procedimento descrito abaixo.

[00092] 140 µl de gel de colágeno, o qual foi preparado por combinar quantidades iguais de Adjuvante Completo H37Ra e 0,3% de colágeno tipo II derivado de articulação de bovinos, foram administrados intracutaneamente a camundongos DBA/1JN de 9 semanas de idade na ponta da cauda (Dia 0; sensibilização). Após três semanas, o gel de colágeno preparado pelo mesmo procedimento foi administrado intracutaneamente no dorso para induzir o início da artrite (Dia 21; indução). De acordo com os pesos corporais dois dias antes da sensibilização (Dia -2), 16 camundongos foram divididos em dois grupos, cada um incluindo 8 camundongos, para estabelecer um grupo administrado com meio e um grupo administrado com BM095. Usando como um meio 20 mmol/l de tampão de acetato (pH 5,5) (200 mmol/l de NaCl) diluído 6 vezes com PBS, a substância de teste BM095 foi administrada intravenosamente aos 8 camundongos do grupo administrado com BM095 na dose de 10 mg/ kg de peso no dia antes da administração (Dia 1). Entretanto, o mesmo volume do meio por unidade de peso corporal foi administrada aos 8 camundongos no grupo administrado com meio como um grupo de controle no Dia 1. O edema nos quatro membros foi observado e avaliado por escores (em escala de 0 a 4 para cada membro: escore total 16) desde o dia antes da indução (Dia 20) em intervalos de 2 a 3 dias.

[00093] Como um resultado, o escore para edema nos quatro membros foi visto diminuir após o Dia 20 no grupo administrado com

BM095 como visto na figura 6. Isso sugere que BM095 tem o efeito de suprimir o início da artrite.

Exemplo 7: avaliação da eficácia de fármacos usando modelo de artrite induzida por colagenase (osteoartrite)

[00094] Preparação de camundongos modelo e avaliação da eficácia de fármacos foram obtidas pelo procedimento descrito abaixo.

[00095] Um meio de controle (tampão de acetato a 20 mmol/l (pH 5,5) diluído 6 vezes com PBS, NaCl a 200 mmol/l (n=5)), BM095 a 2 mg/kg (n=5), e 20 mg/kg BM095 (n=6) foram administrados (5 ml/kg) intravenosamente nas veias caudais de machos de 8 semanas de idade C57BL/6J Jcl (CLEA Japan Inc.). A seguir, 6 µl de solução de colagenase a 1,5% (Tipo II; Sigma) filtrada através de filtro de 0,45 µm (MILLIPORE) foram administrados nas cavidades das articulações do joelho sob anestesia com inalação de 3% de isoflurano (Am J Pathol 1989; 135(6):1001-14).

[00096] Os comprimentos das articulações direita e esquerda foram determinados usando compassos de calibre (Mitsutoyo CO.) imediatamente antes da administração de colagenase e 3, 7, e 14 dias após a administração de colagenase para calcular a diferença entre a direita e esquerda. A diferença foi definida como um valor representativo para o edema da articulação do joelho direito. A área sob a curva (AUC) de transição desta diferença foi determinada com base na regra trapezoidal, e definida como um indicador de eficácia do fármaco. O teste de t-Student foi conduzido para a AUC do grupo de controle do meio e do grupo administrado com BM095 usando um programa de análise estatística (SAS Institute Inc.) (uma diferença significativa é assumida quando $p < 0,05$). Como um resultado, a AUC do grupo administrado com BM095 foi significativamente menor do que aquela do grupo do controle com meio, como visto na Fig. 7. Este resultado demonstra que BM095 suprime artrite no modelo de

osteoartrite.

Exemplo 8: Preparação de anticorpo neutralizante anti-NR 10 humana [00097] Camundongos foram imunizados com proteína NR 10 humana (domínio extracelular) {descrita no Exemplo 2}, e hibridomas foram preparados por métodos convencionais. Os sobrenadantes da cultura dos hibridomas foram testados quanto a atividade neutralizante usando a linhagem celular dependente de IL-31 humana descrita no Exemplo 1. Múltiplos clones que exibem forte atividade neutralizante de NR 10 foram obtidos (Fig. 8).

Exemplo 9: Preparação de anticorpo quimérico humano

[00098] A sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada de NA633, que exibiu a atividade mais forte entre os anticorpos neutralizantes, é mostrada em SEQ ID NO: 16, e a sequência de aminoácido da região variável da cadeia leve é mostrada em SEQ ID NO: 17. Além disso, as sequências de aminoácido de CDR1, CDR2, e CDR3 da região variável da cadeia pesada de NA633 são mostradas em SEQ ID NOs: 18, 19, e 20, respectivamente; e as sequências de aminoácido de CDR1, CDR2, e CDR3 da região variável da cadeia leve são mostradas em SEQ ID NOs: 21, 22, e 23, respectivamente.

[00099] Além disso, um anticorpo quimérico que compreende a região variável de camundongo descrita acima e a região constante humana (cadeia H do tipo IgG1; cadeia L tipo κ) foi preparada por um método convencional, e a atividade de neutralização foi determinada. Como mostrado na figura 9, o anticorpo quimérico NA633 exibiu forte atividade neutralizante em baixas concentrações.

Exemplo 10: isolamento de NR 10 de macaco cinomolgo

[000100] Os inventores tentaram isolar o gene de NR 10 de macaco cinomolgo, porque a reatividade cruzada e a atividade neutralizante a NR 10 de macaco cinomolgo foram tidas como importantes na

avaliação da segurança na etapa pré-clínica. Os iniciadores foram desenhados com base na informação genômica de macaco Rhesus descrita e semelhantes, e o gene NR 10 foi amplificado com sucesso a partir de órgãos de macacos cinomolgos por PCR. Um alinhamento das sequências de aminoácido de NR 10 humana e NR 10 de macaco cinomolgo isolada é mostrado na figura 10. A sequência de aminoácido de NR 10 de macaco cinomolgo é mostrada em SEQ ID NO: 24. Uma linhagem celular em proliferação de uma foram dependente de IL-31 humana foi estabelecida por introduzir o gene de NR 10 de macaco cinomolgo junto com o gene de OSMR humano em células Ba/F3, conforme descrito no exemplo 1. A atividade neutralizante do anticorpo quimérico NA633 descrito no exemplo 9 foi testada usando esta linhagem celular. O resultado demonstrou que o anticorpo também exibiu forte atividade neutralizante em macaco cinomolgo (figura 11).

Exemplo de Referência 1: eficácia farmacológica de BM095 em colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS)

[000101] O modelo de colite induzida por DSS (J Immunol (2003) 171:5507-5513), que foi relatado como um modelo patológico para doença inflamatória do intestino (IBD) foi preparado para avaliar o efeito de BM095, um anticorpo neutralizante anti-NR 10. Uma solução aquosa de Sal Sódio de Dextran Sulfato (Wako Pure Chemical Industries) a 5% (p/v) foi preparada usando água destilada filtrada e esterilizada com filtro de 0,22 µm (Millipore). Camundongos machos Balb/cAnN Crj de 6 semanas de idade (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN) foram deixados beber livremente a solução das garrafas de água por 7 dias. Os pesos corporais foram medidos, e as alterações percentuais no peso em relação aos pesos no primeiro dia da administração de DSS foram usadas como um índice para a eficácia do fármaco.

[000102] Usando este modelo, o anticorpo neutralizante anti-NR 10

de camundongo BM095 foi administrado intravenosamente em uma dose de 10 mg/kg no dia antes da administração de DSS e o peso resultante foi avaliado (n=10) para testar se a condição patológica foi melhorada pela sinalização de IL-31 neutralizante. O grupo (grupo de veículo; n=10) no qual um veículo (uma mistura de tampão de acetato [20 mmol/L de acetato de sódio e 20 mmol/L de cloreto de sódio] e solução salina tamponada com fosfato [PBS; GIBCO], as quais foram misturadas em uma proporção de volume de 1:5) foi administrado intravenosamente no dia antes da administração de DSS, foi usado como um grupo de controle com veículo. Além disso, o decorrer da alteração percentual do peso em camundongos Balb/cAnN Crj do mesmo sexo e idade (n=1) que aqueles no grupo administrado com DSS também foi investigado para saber o curso de tempo da alteração percentual do peso em camundongos normais.

[000103] O curso do peso é mostrado na figura 12. A administração de DSS reduziu a alteração percentual do peso no grupo-veículo. O curso da alteração percentual do peso no grupo administrado com BM095 foi similar àquela no grupo-veículo. Entretanto, quatro e cinco dias após a administração de DSS, a alteração percentual do peso foi significativamente reduzida no grupo de BM095 quando comparado ao grupo-veículo. Estes resultados mostraram que a administração de BM095 não produziu efeito terapêutico sobre colite do modelo.

[000104] Foi relatado que a expressão de IL-31RA está aumentada neste modelo (WO 2004/003140). Os resultados experimentais descritos cima demonstram que anticorpos que neutralizam a molécula não produzem efeitos terapêuticos sobre colite neste modelo.

Exemplo de Referência 2: eficácia farmacológica de BM095 no modelo de dermatite de contato aguda induzida por cloreto de picrila

[000105] Para avaliar o efeito do anticorpo neutralizante anti-NR 10 de camundongo BM095, uma Dermatite relatada como um modelo de

dermatite aguda de contato (Clin Immunol (2003) 108: 257-262) foi desenvolvida. Esta Dermatite é um resultado de uma reação de hipersensibilidade retardada devido à sensibilização e indução pela aplicação de cloreto de picrila. 50 µL de uma solução de cloreto de picrila a 7% (Nacalai Tesque, Inc.; etanol: acetona = 3:1 (v/v)) foram aplicados sobre a pele abdominal para sensibilizar camundongos fêmeas Balb/cAnN Crj de 8 semanas de idade (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN), e após 5 dias, 20 µL de solução de cloreto de picrila a 1% (acetona: oliva = 1:4 (v/v)) foram aplicados sobre a pele dos pavilhões auriculares do lado direito para fazer surgir uma dermatite de contato (Indução). 20 µL de um veículo (acetona: oliva = 1:4 (v/v)) foram aplicados sobre pele dos pavilhões auriculares do lado esquerdo dos mesmos camundongos como um controle para avaliar o efeito do veículo sobre a espessura do pavilhão auricular. (Grupo positivo; n=6). A espessura das orelhas direita e esquerda foram medidas usando um calibrador de espessura *Dial Thickness Gauge* (OZAKI MFG.) imediatamente antes da indução e 24, 48, e 72 horas após a indução, e a alteração na espessura do pavilhão auricular em relação à espessura imediatamente antes da indução foi usada como um índice para a eficácia do fármaco.

[000106] O grupo (grupo Negativo; n=6) no qual uma mistura de etanol: acetona (3:1 (v/v)) sem cloreto de picrila foi aplicada na pele abdominal no momento da sensibilização, e após 5 dias, 20 µL de solução de cloreto de picrila a 1% foram aplicados sobre a pele do pavilhão auricular direito e 20 µL de um veículo (acetona: oliva = 1:4 (v/v)) foram aplicados sobre a pele do pavilhão auricular esquerdo foi usado como um grupo de controle para avaliar o estabelecimento das condições patológicas.

[000107] O grupo (grupo BM095; n=6), no qual a dermatite aguda de contato foi induzida pelo mesmo método que aquele usado para o

grupo Positivo descrito acima e a seguir BM095 foi administrado intravenosamente a 10 mg/kg nos dias antes da sensibilização e indução, e o grupo (grupo-veículo; n = 5) no qual no mesmo momento foi administrado um veículo (tampão de acetato [acetato de sódio a 20 mmol/L e cloreto de sódio a 20 mmol/L] e salina fisiológica tamponada com fosfato [PBS; GIBCO], os quais foram combinados em uma proporção de volume de 1:5), foi usado para avaliar o efeito da administração de anticorpos anti-NR 10 sobre as condições patológicas no sistema modelo.

[000108] As alterações na espessura dos pavilhões auriculares até 72 horas após a indução são mostradas na figura 13. O pavilhão auricular foi visto significativamente espessado no grupo Positivo em cada ponto de tempo de 24, 48, e 72 horas após a indução quando comparado ao grupo Negativo, sugerindo estabelecimento das condições patológicas. A transição da espessura dos pavilhões auriculares no grupo BM095 foi semelhante ao grupo-veículo, e assim, nenhuma supressão significativa foi descoberta.

[000109] Os resultados descritos acima demonstram que a administração de BM095 não produziu efeito terapêutico sobre a dermatite de contato aguda observada neste modelo.

Aplicabilidade Industrial

[000110] A presente invenção fornece novos agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias. Os agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias fornecidos pela presente invenção compreendem como um ingrediente ativo um antagonista de NR 10, mais preferivelmente, um anticorpo que tem atividade neutralizante de NR 10.

[000111] Terapia anticitocina baseada em anticorpo monoclonal está atraindo muita atenção recentemente. Em várias condições patológicas reais, entretanto, tem sido difícil produzir efeitos

terapêuticos por bloquear uma única citocina, porque vias compensatórias são ativadas. Além disso, foi difícil estimar em que tipo de doenças os efeitos terapêuticos poderiam ser obtidos por bloquear a citocina-alvo. Sob a circunstância descrita acima, os presente inventores descobriram que anticorpos neutralizantes anti-NR 10 poderiam suprimir significativamente os sintomas em camundongos modelo com dermatite atópica, dermatite crônica, reumatismo, osteoartrite, ou semelhantes.

[000112] Os presentes inventores também foram bem sucedidos em preparar anticorpos neutralizantes de NR 10 humana. Agentes para prevenir ou tratar doenças inflamatórias, as quais compreendem como um ingrediente ativo anticorpos neutralizantes de NR 10, são altamente úteis para aplicação clínica a seres humanos.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo anti-NR10/IL-31RA com atividade neutralizante de NR10/IL-31RA,

caracterizado pelo fato de que é para produzir um agente para prevenir ou tratar uma doença inflamatória, em que a doença inflamatória é

(a) dermatite atópica, em que o anticorpo suprime pelo menos um dos sintomas de dermatite atópica selecionado do grupo consistindo em: (1) prurido, (2) vermelhidão e sangramento, (3) edema, (4) injúria e dano tecidual e (5) incrustação e ressecamento;

(b) reumatismo; ou

(c) osteoartrite.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o NR 10/IL-31RA é NR 10/IL-31RA humano.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo recombinante.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo recombinante é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

FIG. 1

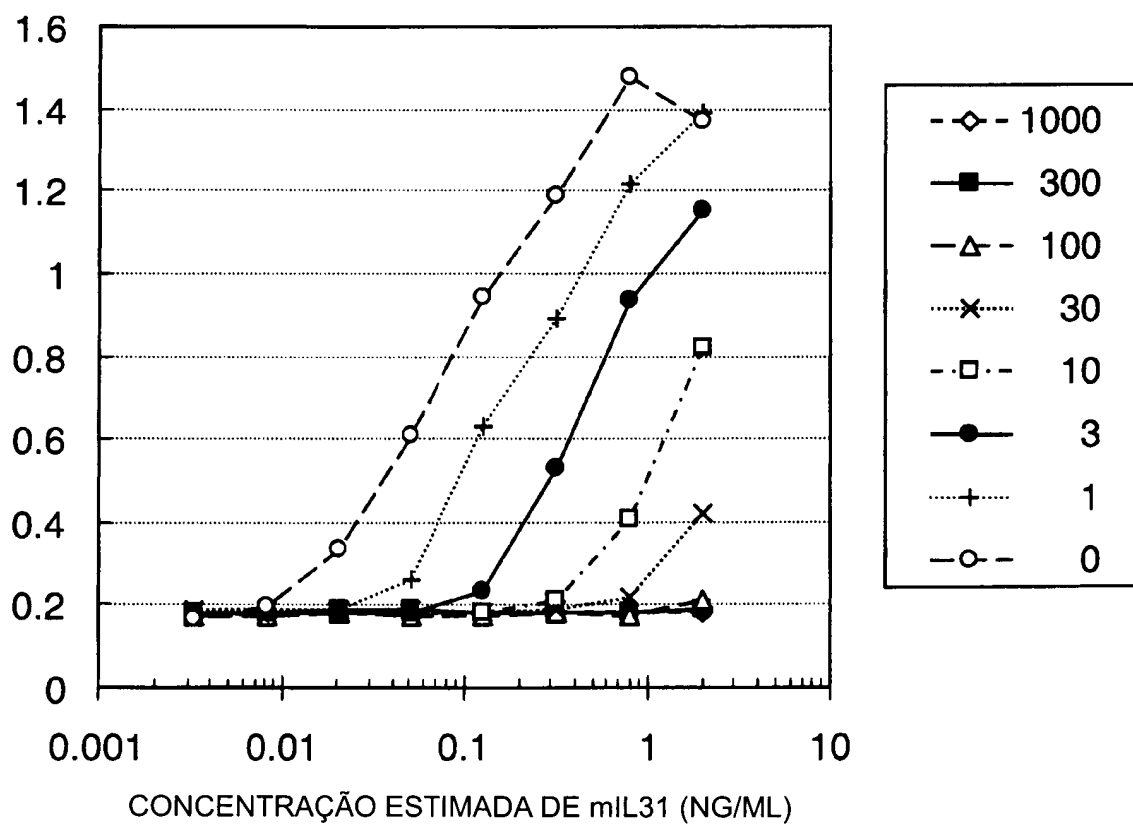


FIG. 2

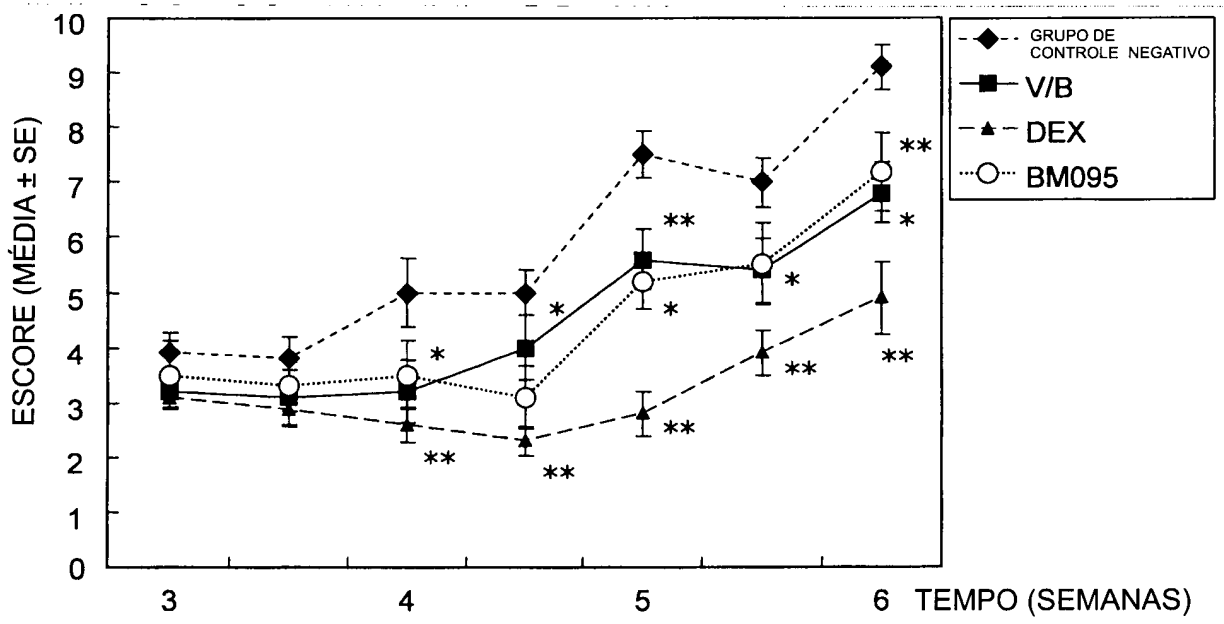


FIG. 3

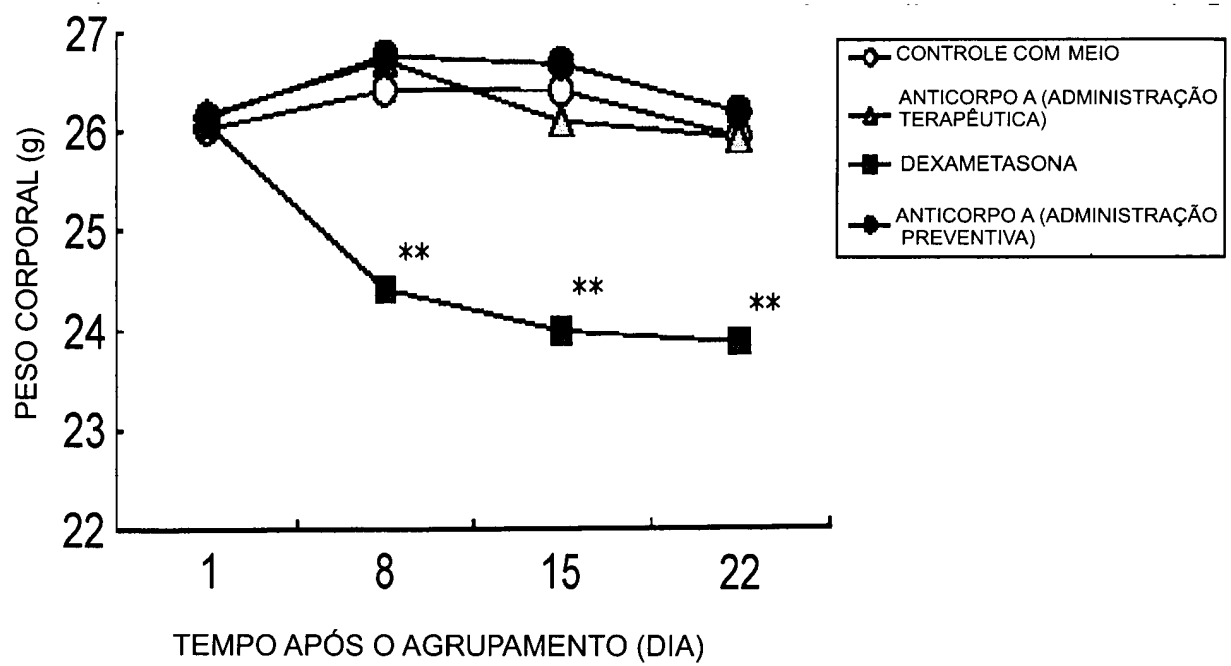


FIG. 4

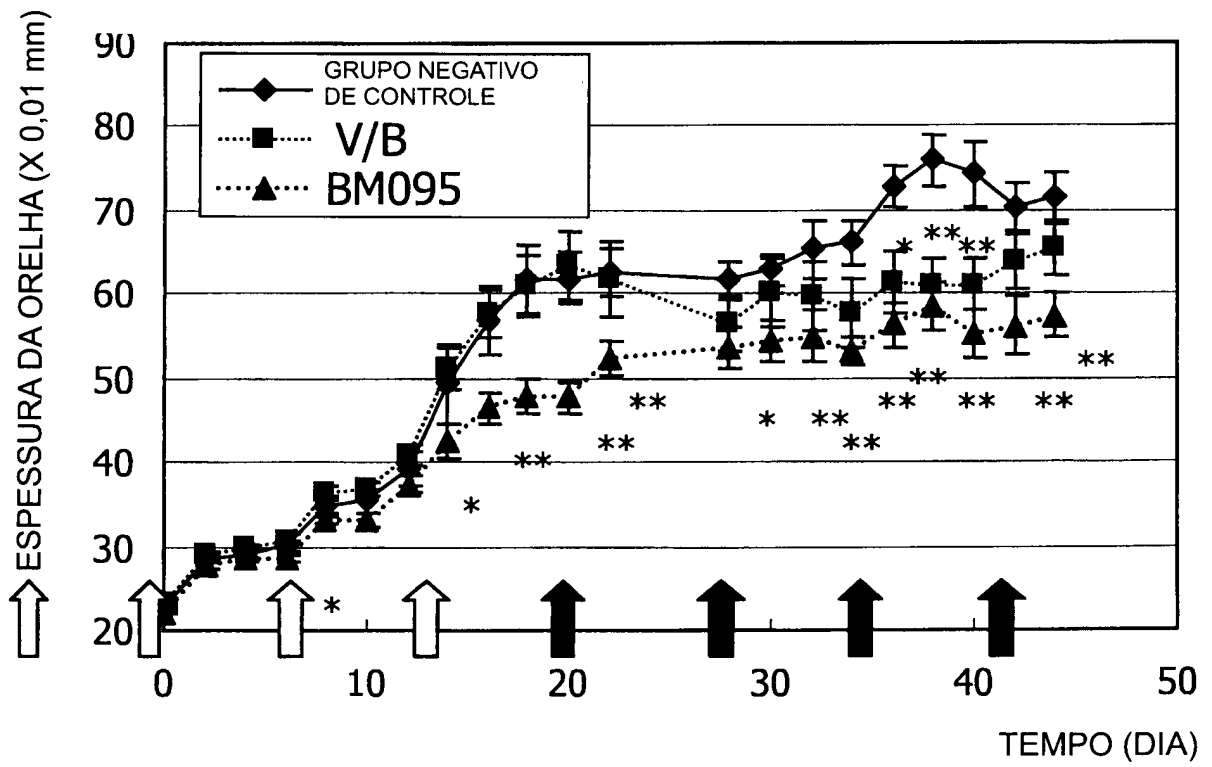


FIG. 5

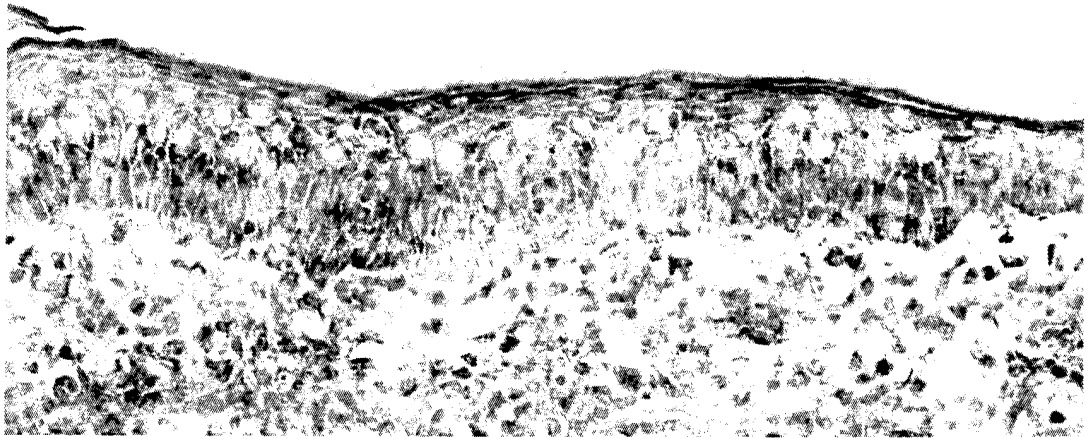


FIG. 6

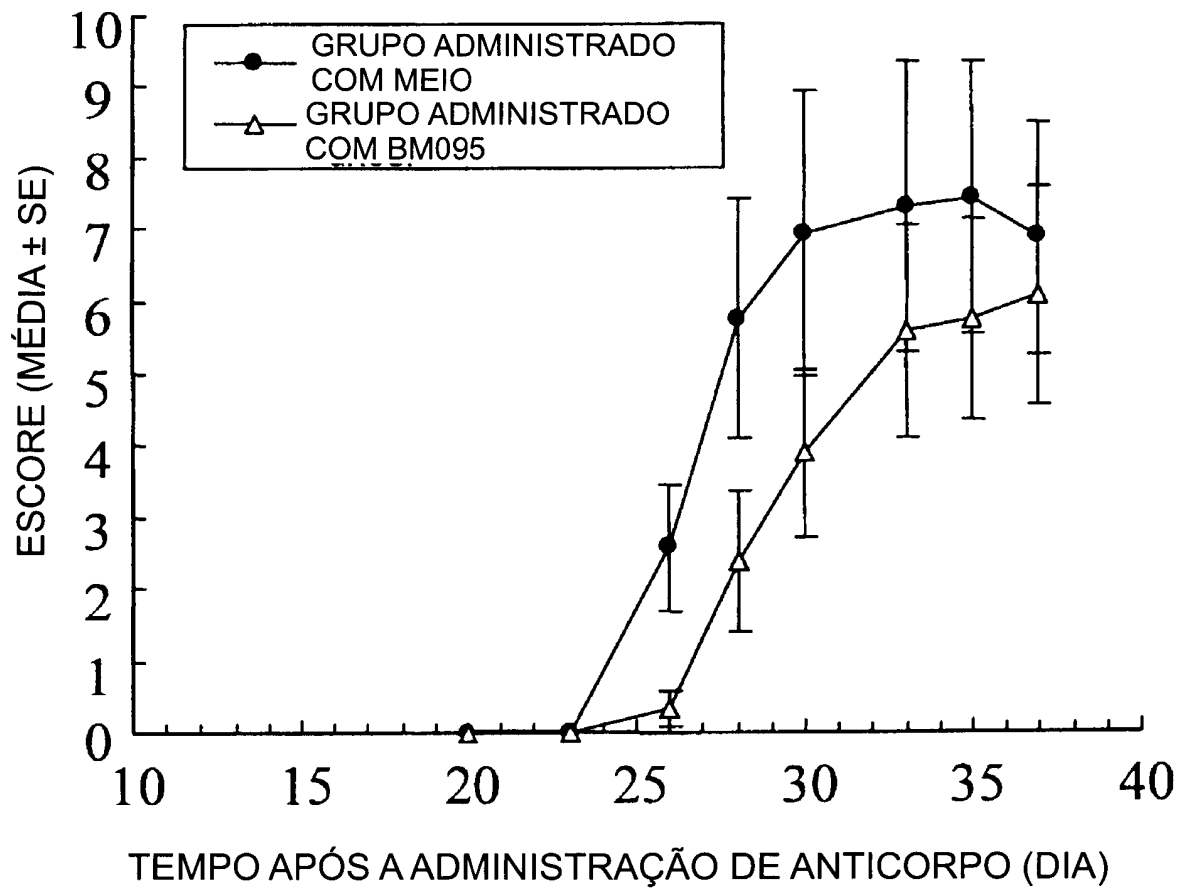


FIG. 7

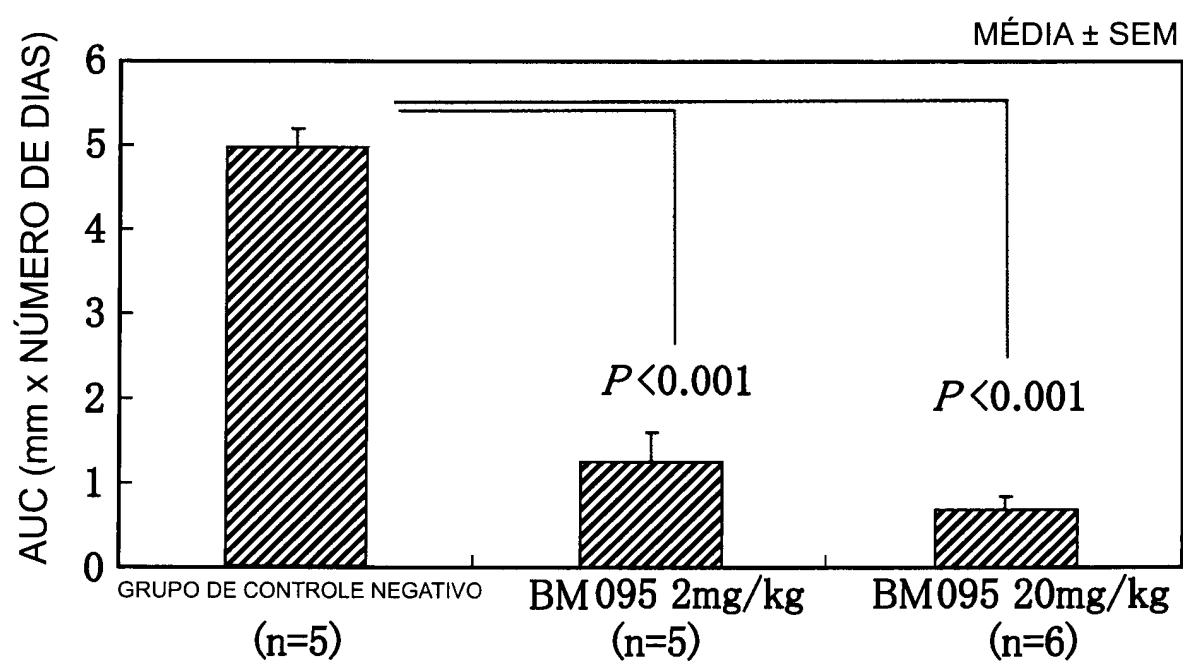


FIG. 8

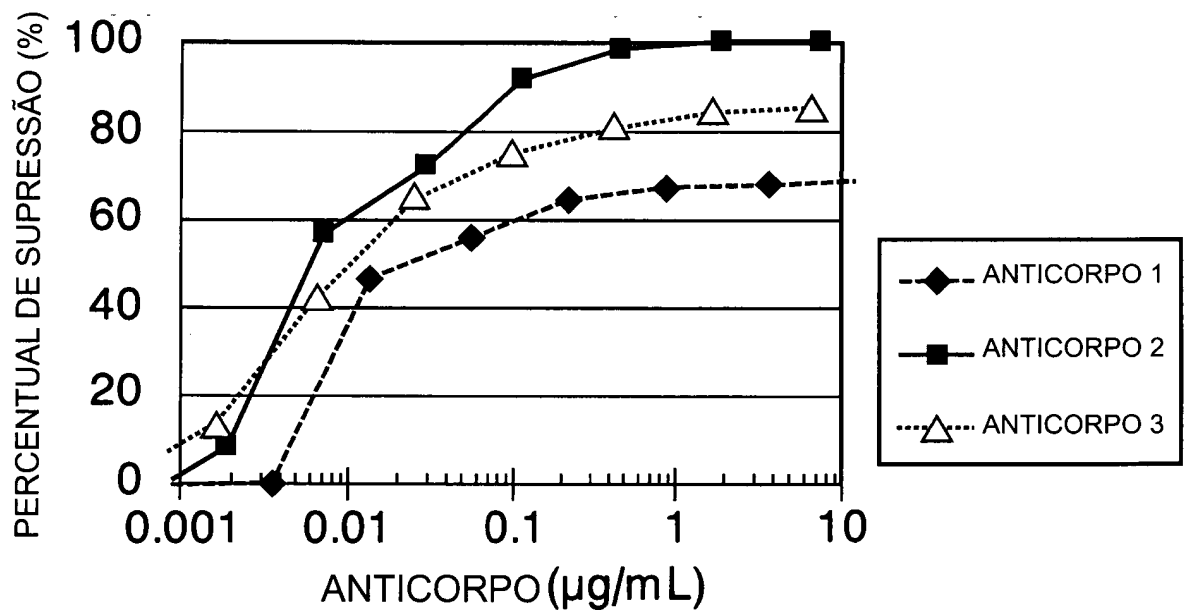
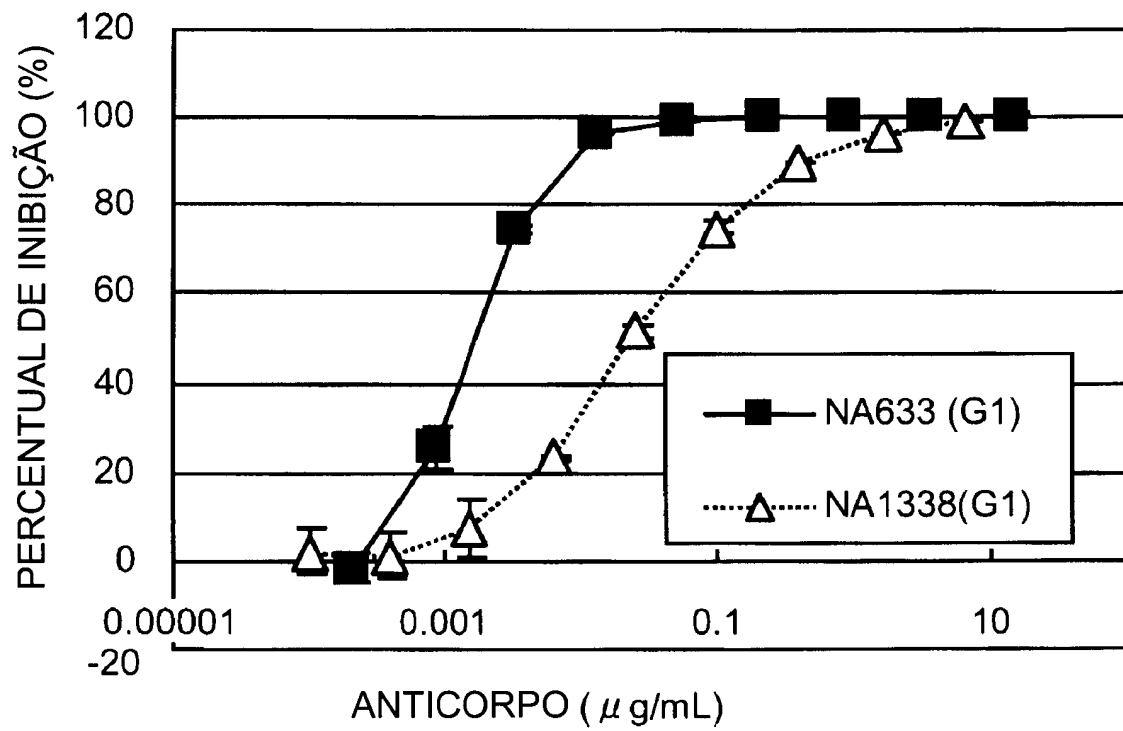


FIG. 9



CINOMOL	MMWTTWALWIMFPLLCKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLCTWSPGKETSQYTAKRTYAFGKKHDNCTSSSTSENRASCSFFLPRITIPDNYTIEVEA
HUMANO	MMWTTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYRKNLCTWSPGKETSQYTVKRTYAFGEKHDNCTNSSTSENRASCSFFLPRITIPDNYTIEVEA
CINOMOL	ENGGVVKSDMTCWRLEDIAKTEPPEIFSVKPVLGIKRMIQIEWIKPELAPVSSDLKYALREFRTVNSTSWMEVNFVAKNRKDTNQTYNLMGLQAFTEYWA
HUMANO	ENGGVVKSHMTYWRLENIKTEPPKIFRVKPVLGIKRMIQIEWIKPELAPVSSDLKYALREFRTVNSTSWMEVNFVAKNRKDTNQTYNLTGLQPFTEYVA
CINOMOL	LRCVAKESKFWSDWSQEKMGMTTEEEAPCGLELWRVLPKTEVDGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYFPENNTNLTETVNTTINQQLLEHLGGESYVW
HUMANO	LRCVAKESKFWSDWSQEKMGMTTEEEAPCGLELWRVLPKPAEADGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYYPESNTNLTETMNTTINQQLLEHLGGESFWW
CINOMOL	SMISYNSLGKSPVTTLRIPAIQEKSFRCIEVMQACLAEDQLVKKWSSALDVNTWMIWFPPDMSEHPTLSWESVSDATNWTIQDDKCLKPFWCYNISVYP
HUMANO	SMISYNSLGKSPVATLRIPAIQEKSFQCIEVMQACVAEDQLVKKWSSALDVNTWMIWFPPDVDEPTLSWESVSDATNWTIQDDKCLKPFWCYNISVYP
CINOMOL	MLHDVYGEPEYSIQAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGIICNYTIFYQAEKGGKGFSKTVNSSILOYGLESKRKTSYTVRVMASTSA
HUMANO	MLHDVYGEPEYSIQAYAKEGVPSEGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGIICNYTIFYQAEKGGKGFSKTVNSSILOYGLESKRKTSYIQQVMASTSA
CINOMOL	GGINGTSINFKTILSFSVFEIILITSLIGGGLLILILTVAYGLKPKPNKLTMLCWPSVNPAPAESIA TWRGDDFKDKLNLKESDSDSWNTEDRILKPCSTPS
HUMANO	GGTNGTSINFKTILSFSVFEIILITSLIGGGLLILILTVAYGLKPKPNKLTMLCWPTVNPAPAESIA TWHGDDFKDKLNLKESDSDSWNTEDRILKPCSTPS
CINOMOL	DKLVIDKSVWNFGNVLQEMFTDEARTGQENNLGGEKNEYVTHPFRADCP L GKSFEEELPVSP E IPPRKSOYLRSRMPEGTCL E AEEQLLVSGSLES L APD
HUMANO	DKLVIDKLVNFGNVLQEIFTDEARTGQENNLGGEKNGYVTC PF FRPDC PL GKSFEEELPVSP E IPPRKSOYLRSRMPEGT R PEAKEQLLFSGQSL --- VPD
CINOMOL	HVREAAAPNPYLKNSVTTREFLYSQKLPEHTKGEV 735 (SEQ ID NO: 24)
HUMANO	HLC EE GAPNPYLKNSVTAREFLYSEKLP EH TKGEV 732 (SEQ ID NO: 7)

FIG. 10

FIG. 11

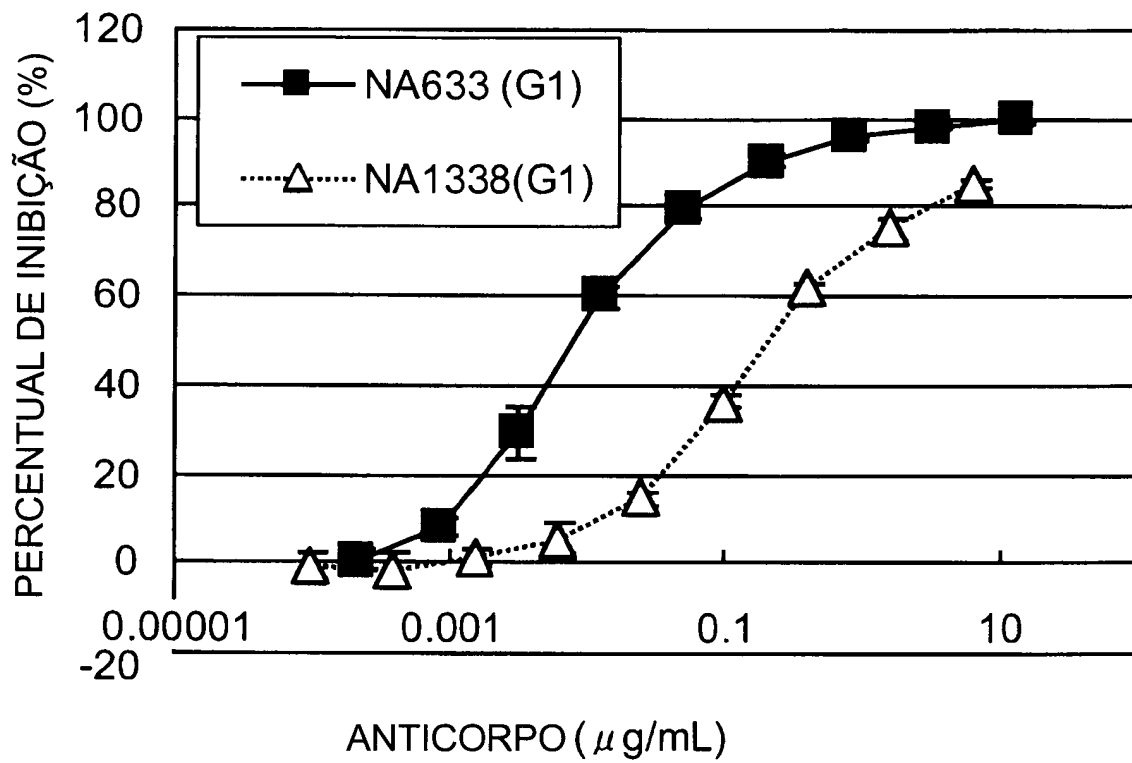


FIG. 12

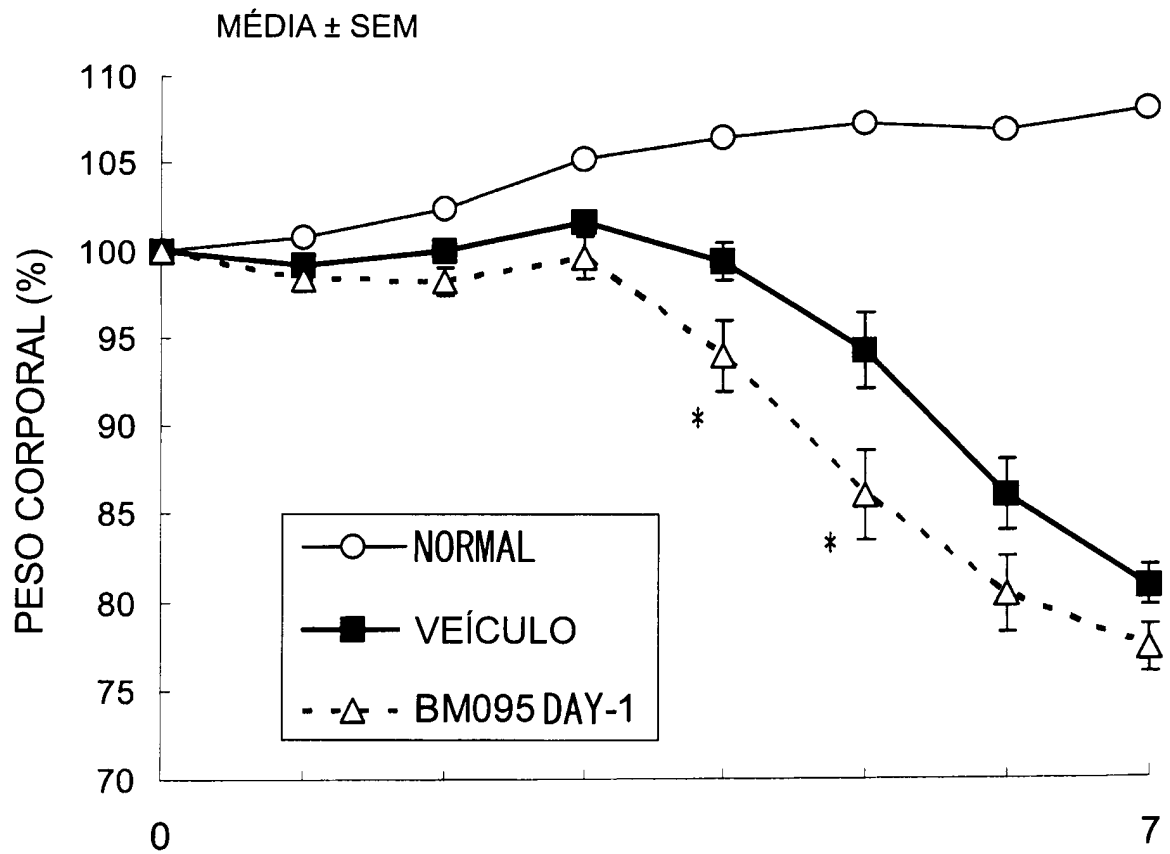


FIG. 13

