



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611069-0 A2**

(22) Data de Depósito: 08/05/2006
(43) Data da Publicação: 09/11/2010
(RPI 2079)



(51) Int.Cl.:
C07K 16/24
C07K 14/54
A61P 17/00
A61P 17/04

(54) Título: **ANTICORPO MONOCLONAL, ANTICORPO HUMANIZADO, FRAGMENTO DE ANTICORPO, USO DE UM ANTAGONISTA, E, HIBRIDOMA**

(30) Prioridade Unionista: 06/05/2005 US 60/678918, 01/07/2005 US 60/696251, 26/08/2005 US 60/711600, 06/05/2005 US 60/678918, 06/05/2005 US 60/678918, 01/07/2005 US 60/696251, 01/07/2005 US 60/696251, 26/08/2005 US 60/711600

(73) Titular(es): ZYMOGENETICS, INC.

(72) Inventor(es): Aaron C. Haran, Anthony W. Siadak, Elin Florkiewicz, Janine Bilsborough, Shirley Rene

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006017827 de 08/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/122079 de 16/11/2006

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL, ANTICORPO HUMANIZADO, FRAGMENTO DE ANTICORPO, USO DE UM ANTAGONISTA, E, HIBRIDOMA. A presente invenção diz respeito a métodos de tratar doenças pruríticas, incluindo mas não limitadas à Dermatite de contato, Dermatite atópica, Reações alérgicas cutâneas do tipo demorada induzidas por medicamento, Necrólise epidérmica tóxica, Linfoma de célula T cutâneo, Pênfigo bolhoso, Alopecia wereata, Vitiligo, Acne Rosácea, Prurigo nodular, Escleroderma, Vírus do herpes simples ou combinação destes pela administração de anticorpos monoclonais IL-3 1. A invenção fornece ainda os hibridomas que geram os anticorpos monoclonais.

“ANTICORPO MONOCLONAL, ANTICORPO HUMANIZADO, FRAGMENTO DE ANTICORPO, USO DE UM ANTAGONISTA, E, HIBRIDOMA”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

5 O sistema imune hospeda uma ampla faixa de tipos de célula específicos incluindo linfócitos. Os linfócitos determinam a especificidade da reação imune em um hospedeiro e incluem duas classes, os linfócitos B, que são precursores de células que produzem anticorpo e os linfócitos T, que são requeridos para certas funções reguladoras tais como o desenvolvimento de
10 respostas imunes específicas.

As células T maduras podem ser ativadas, isto é, por um antígeno ou outro estímulo, para produzir, por exemplo, citocinas, moléculas de sinalização bioquímica ou receptores que influenciam ainda o destino da população de célula T.

15 As células B podem ser ativadas por intermédio de receptores na sua superfície celular incluindo receptor de célula B e outras moléculas acessórias para realizar as funções de célula acessória, tais como a produção de citocinas.

Os monócitos/macrófagos e células T podem ser ativados
20 pelos receptores na sua superfície celular e desempenham um papel central na resposta imune pela apresentação de antígeno aos linfócitos e também atuam como células acessórias para linfócitos pela secreção de numerosas citocinas.

As células exterminadoras naturais (NK) têm uma célula progenitora comum com as células T e células B e desempenham um papel na
25 supervisão imune. As células NK, que compreendem até 15% de linfócitos sangüíneos, não expressam receptores antigênicos e portanto não usam o reconhecimento de MHC como exigência para a ligação a uma célula alvo. As

células NK estão envolvidas no reconhecimento e morte de certas células de tumor e células viralmente infectadas. *In vivo*, acredita-se que as células NK requeiram ativação, entretanto, *in vitro*, as células NK mostraram matar alguns tipos de células de tumor sem ativação.

5 As interleucinas são uma família de citocinas que medeiam respostas imunológicas, incluindo inflamação. As interleucinas medeiam uma variedade de patologias inflamatórias. Centrais a uma resposta imune estão as células T, que produzem muitas citocinas e imunidade adaptativa aos antígenos. As citocinas produzidas pelas células T foram classificadas como

10 tipo 1 e tipo 2 (Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76: 300-317, 1998). As citocinas tipo 1 incluem IL-2, IFN- γ , LT- α e estão envolvidas em respostas inflamatórias, imunidade viral, imunidade parasítica intracelular e rejeição de aloenxerto. As citocinas tipo 2 incluem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e estão envolvidas em respostas humorais, imunidade helmíntica e resposta alérgica.

15 As citocinas compartilhadas entre Tipo 1 e 2 incluem IL-3, GM-CSF e TNF- α . Existe alguma evidência para sugerir que as populações de célula T que produzem Tipo 1 e Tipo 2 preferencialmente migram em tipos diferentes de tecido inflamado.

A pele desempenha um papel importante no sistema imune e

20 consiste de camadas. A epiderme é uma camada de superfície. Por debaixo da epiderme está a derme, uma camada de tecido conectivo. Por debaixo da derme, está a hipoderme, uma camada de quantidades grandes de tecido adiposo. Os linfócitos T circulantes migram para a pele sob condições normais e inflamatória. O antígeno de linfócito cutâneo (CLA) é considerado

25 um receptor residente para as células T com tropismo para a pele. Santamaria-Babi, L., Eur. J. Dermatol. 14: 13-18, 2004.

Diversas doenças da pele são conhecidas para expressar níveis altos de células T CLA+, incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por medicamento, vírus trópico de pele e prurido

associado com vírus, vitiligo, linfoma de célula T cutâneo, alopecia aerada, acne rosácea, acne vulgar, prurido nodular e pênfigo bolhoso. Existe uma necessidade para tratar tais doenças mediadas pela célula T da pele.

As atividades demonstradas *in vivo* da família da citocina ilustra o enorme potencial clínico de e necessidade quanto a, outras citocinas, agonistas de citocina e antagonistas de citocina. IL-31, uma citocina recém identificada. A IL-31, quando super-expressada em camundongos, resulta em sintomas equivalentes à dermatite. Tanto as células T residentes da pele quanto os queratinócitos epidérmicos foram implicados na patologia de doenças de pele em seres humanos. A presente invenção trata estas necessidades pelo fornecimento de antagonistas para a citocina IL-31 pró-inflamatórias. Tais antagonistas da presente invenção, que podem bloquear, inibir, reduzir, antagonizar ou neutralizar a atividade de IL-31, incluem receptores IL-31RA solúveis e anticorpos anti-IL-31 neutralizadores. A invenção fornece ainda usos para estes em doença inflamatória, assim como composições e métodos relacionados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Antes de apresentar a invenção em detalhes, pode ser útil para o seu entendimento definir os seguintes termos:

Como aqui usado, o termo “anticorpos” inclui anticorpos policlonais, anticorpos policlonais purificados por afinidade, anticorpos monoclonais e fragmentos de ligação de antígeno, tais como fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ e Fab. Anticorpos intactos ou fragmentos geneticamente engendrados, tais como anticorpos quiméricos, fragmentos Fv, anticorpos de cadeia única e outros, assim como peptídeos e polipeptídeos de ligação de antígeno sintéticos, também são incluídos. Anticorpos não humanos podem ser humanizados enxertando-se CDRs não humanas sobre as regiões de matriz e constantes humanas ou incorporando-se os domínios variáveis não humanos inteiros (opcionalmente “ocultando” os mesmos com uma superfície

equivalente à humana pela substituição de resíduos expostos, em que o resultado é um anticorpo “embutido”). Em alguns casos, os anticorpos humanizados podem reter resíduos não humanos dentro dos domínios de estrutura da região variável humana para realçar as características de ligação apropriadas. Através da humanização de anticorpos, a meia-vida biológica pode ser aumentada e o potencial para as reações imune adversas na administração aos seres humanos é reduzido.

Os termos “anticorpo quimérico” ou “anticorpos quiméricos” referem-se aos anticorpos cujos genes de cadeia leve e pesada foram construídos, tipicamente pela engenharia genética, a partir dos genes das regiões variáveis e constante da imunoglobulina que pertencem às espécies diferentes. Por exemplo, os segmentos variáveis dos genes de um anticorpo monoclonal de camundongo podem ser unidos aos segmentos constantes humanos, tais como gama 1 e gama 3. Um anticorpo quimérico terapêutico típico é assim uma proteína híbrida composta do domínio variável ou domínio de ligação de antígeno de um anticorpo de camundongo e o domínio constante de um anticorpo humano, embora outras espécies de mamífero possam ser usadas.

Como aqui usado, o termo “imunoglobulina” refere-se a uma proteína que consiste de um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados pelos genes da imunoglobulina. Uma forma de imunoglobulina constitui a unidade estrutural básica de um anticorpo. Esta forma é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de cadeias de imunoglobulina, cada par tendo uma cadeia leve e uma pesada. Em cada par, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada são juntas responsáveis pela ligação a um antígeno e as regiões constantes são responsáveis pelas funções efetoras do anticorpo.

As “cadeias leves” da imunoglobulina de tamanho natural (cerca de 25 Kd ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene da região

variável no terminal NH₂ (cerca de 110 aminoácidos) e um gene da região constante capa ou lambda no terminal COOH. As “cadeias pesadas” de imunoglobulina de tamanho natural (cerca de 50 Kd ou 446 aminoácidos), são similarmente codificadas por um gene da região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes da região constante anteriormente mencionada (cerca de 330 aminoácidos). As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou épsilon e define o isótipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro das cadeias leve e pesada, as regiões variáveis e constantes são unidos por uma região “J” de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região “D” de cerca de 10 mais aminoácidos. (ver no geral, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7 (incorporada por referência em sua totalidade para todos os propósitos).

Uma região variável de cadeia leve ou pesada da imunoglobulina consiste de uma região de “estrutura” interrompida por três regiões hipervariáveis. Assim, o termo “região hipervariável” refere-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido de uma “Região Determinadora de Complementaridade” ou “CDR” (isto é, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) nos domínios variáveis de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) nos domínios variáveis de cadeia pesada (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou aqueles resíduos de uma “alça hipervariável” (isto é, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) nos domínios variáveis de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) nos domínios variáveis de cadeia pesada; Chothia e Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917) (ambas as quais são aqui incorporadas por referência). “Região Estrutural” ou resíduos “FR” são aqueles resíduos de domínio variável outro que não os resíduos da região

hipervariável como aqui definidos. As seqüências das regiões de estrutura de cadeias leves ou pesadas diferentes são relativamente conservadas dentro de uma espécie. Assim, uma “região estrutural humana” é uma região estrutural que é substancialmente idêntica (cerca de 85% ou mais, usualmente 90 a 95% ou mais) com a região estrutural de uma imunoglobulina humana que ocorre naturalmente. A região estrutural de um anticorpo, isto é as regiões estruturais combinadas do constituinte de cadeias leves e pesadas, serve para posicionar e alinhar as CDR's. As CDR's são primariamente responsáveis pela ligação a um epítopo de um antígeno.

Conseqüentemente, o termo imunoglobulina “humanizada” refere-se a um imunoglobulina que compreende uma região estrutural humana e uma ou mais CDR's de uma imunoglobulina não humana (usualmente um camundongo ou rato). A imunoglobulina não humana que fornece as CDR's é chamada de “doadora” e a imunoglobulina humana que fornece a estrutura é chamada de “aceitadora”. As regiões constantes não necessitam estar presentes, mas se elas estiverem devem ser substancialmente idênticas às regiões constantes da imunoglobulina humana, isto é, pelo menos de cerca de 85 a 90%, preferivelmente de cerca de 95% ou mais idênticas. Por este motivo, todas as partes de uma imunoglobulina humanizada, exceto possivelmente as CDR's, são substancialmente idênticas às partes correspondentes das seqüências humanas da imunoglobulina natural. Um “anticorpo humanizado” é um anticorpo que compreende uma imunoglobulina de cadeia leve humanizada e uma de cadeia pesada humanizada. Por exemplo, um anticorpo humanizado não abrangeria um anticorpo quimérico típico como definido acima, por exemplo, porque a região variável inteira de um anticorpo quimérico não é humana.

O termo “anticorpos geneticamente alterados” significa anticorpos em que a seqüência de aminoácido foi variada a partir daquela de um anticorpo nativo. Por causa da relevância de técnicas de DNA

recombinante na geração de anticorpos, não se tem necessidade de estar confinado às seqüências de aminoácidos encontradas em anticorpos naturais; os anticorpos podem ser replanejados para se obter características. As variações possíveis são muitas e variam da mudança de apenas um ou um
 5 poucos aminoácidos ao replanejamento completo, por exemplo, das regiões variáveis ou constantes. As mudanças nas regiões constantes, no geral, serão feitas de modo a melhorar ou alterar características, tais como fixação de complemento, interação com membranas e outras funções efetoras. As mudanças nas regiões variáveis serão feitas de modo a melhorar as
 10 características de ligação de antígeno.

Além de anticorpos, as imunoglobulinas podem existir em uma variedade de outras formas incluindo, por exemplo, anticorpos de cadeia única ou Fv, Fab e (Fab')₂, assim como diacorpos, linear, anticorpos multivalentes ou multiespecíficos híbridos (como descritos acima e em
 15 detalhes em: Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) e em cadeias únicas (por exemplo, Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) e Bird *et al.*, Science, 242, 423-426 (1988), que são aqui incorporadas por referência). (Ver, no geral, Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984) e Hunkapiller e Hood, Nature, 323, 15-16
 20 (1986), que são aqui incorporadas por referência).

Como aqui usado, os termos "Fv de cadeia única," "anticorpos de cadeia única," "Fv" ou "scFv" referem-se aos fragmentos de anticorpo que compreendem as regiões variáveis das cadeias tanto leve quanto pesada, mas carece das regiões constantes, mas dentro de uma única cadeia de
 25 polipeptídeo. No geral, um anticorpo de cadeia única compreende ainda um ligador polipeptídico entre os domínios VH e VL que possibilitam que ele forme a estrutura desejada que possibilitaria a ligação de antígeno. Os anticorpos de cadeia única são debatidos em detalhes por Pluckthun em The Pharmacology of Monoclonals Antibodies, vol. 113, Rosenberg e Moore eds.

Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994); ver também a Publicação do Pedido de Patente Internacional N^o WO 88/01649 e a Pat. U.S. N^{os} 4.946.778 e 5.260.203, as divulgações dos quais são incorporadas por referência para qualquer propósito. Em formas de realização específicas, os anticorpos de cadeia única também podem ser bi-específicos e/ou humanizados.

Um “fragmento Fab” é compreendido de uma cadeia leve e as regiões C_{H1} e variáveis de uma cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula Fab não pode formar uma ligação de dissulfeto com uma outra molécula de cadeia pesada.

Um “fragmento Fab” contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada que contém mais das regiões constantes, entre os domínios C_{H1} e C_{H2}, tal que uma ligação de dissulfeto intercadeia possa ser formada entre duas cadeias pesadas para formar uma molécula F(ab')₂.

Um “fragmento F(ab')₂” contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção das regiões constantes entre os domínios C_{H1} e C_{H2}, tal que uma ligação de dissulfeto intercadeia seja formada entre duas cadeias pesadas.

Os pesos moleculares e comprimentos de polímeros determinados pelos métodos analíticos imprecisos (por exemplo, eletroforese em gel) serão entendidos ser valores aproximados. Quando um tal valor é expressado como “cerca de” X ou “aproximadamente” X, o valor estabelecido de X será entendido ser preciso até $\pm 10\%$.

Todas as referências aqui citadas são incorporadas por referência em sua totalidade.

A presente invenção está fundamentada em parte na descoberta do uso de anticorpos como antagonistas para IL-31 inibindo deste modo a inflamação no geral e os sintomas de dermatite e doenças pruríticas. A invenção fornece o uso de anticorpos monoclonais para inibir, reduzir,

prevenir ou minimizar os efeitos de dermatite e doenças pruríticas como ainda descrito aqui. Em uma forma de realização, a dermatite é a dermatite atópica. Em uma outra forma de realização a dermatite é o prurigo nodular. Em uma outra forma de realização, a dermatite é eczema. IL-31 é um citocina de célula T recém descoberta que, quando super-expressada em camundongos, resulta em sintomas equivalentes à dermatite. Ver também, Dillon, *et al.*, Nature Immunol. 5: 752-760, 2004. Tanto as células T residentes na pele quanto os queratinócitos epidérmico foram implicados na patologia de doenças de pele em seres humanos. O mRNA de IL-31 e a expressão de proteína são restritos à população de célula T CLA⁺ residentes na pele tanto em pacientes de dermatite atópica (AD) quanto indivíduos normais, embora a análise do receptor para IL-31, IL-31RA, pela imunoistoquímica (IHC) sugira níveis levemente mais altos de expressão de IL-31RA nos queratinócitos dérmicos em biópsias de pele de enfermos de AD aguda e crônica comparados com indivíduos normais.

IL-31 é o nome HUGO para um citocina que foi previamente descrita como Zcyto17rlig em um pedido de patente U.S. publicado (Ver a publicação número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003, aqui incorporada por referência). Ver também, Dillon, *et al.*, Nature Immunol., supra. O receptor heterodimérico para IL-31 foi também descrito na 20030224487 como zcytor17 (nome HUGO, IL-31RA) que forma um heterodímero com o receptor beta da Oncostatina M (OSMRbeta). A IL-31 foi isolada de uma biblioteca de cDNA gerada a partir de células de sangue periférico humano ativadas (hPBCs), que foram selecionadas para CD3. CD3 é um marcador de superfície celular único para as células de origem linfóide, particularmente células T. As seqüências de polinucleotídeo e polipeptídeo para IL-31 humana são mostradas nas SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente. As seqüências de polinucleotídeo e polipeptídeo para IL-31 de murino são mostradas nas SEQ ID NOs: 10 e 11, respectivamente. Como aqui usado o

termo, IL-31 significa IL-31 como usado na publicação de patente U.S. número 20030224487, como mostrado acima. A seqüência de sinal secretor de IL-31 é compreendida dos resíduos de aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala) e o polipeptídeo maduro é compreendido dos resíduos de aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como mostrado na SEQ ID NO: 2). Outra análise de seqüenciamento de terminal N de IL-31 purificada a partir de células 293T mostrou um terminal N no resíduo 27 (Leu) como mostrado na SEQ ID NO: 2, com o polipeptídeo maduro compreendido dos resíduos de aminoácido 27 (Leu) a 164 (Thr) (como mostrado na SEQ ID NO: 2).

a seqüência de polipeptídeo para o IL-31RA (receptor de IL-31) é mostrado na SEQ ID NO: 5 e a seqüência de polipeptídeo para o receptor beta de Oncostatina M (OSMRbeta) é mostrado na SEQ ID NO: 7.

Os receptores IL-31RA e OSMRbeta pertencem à subfamília do receptor de citocina de Classe I que inclui, mas não é limitado aos receptores para IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF e G-CSF (para uma revisão ver, Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" em *Cytokine* 5(2): 95-106, 1993). A subunidade IL-31RA é totalmente descrita no Pedido de Patente PCT de propriedade comum Nº US01/20484 (Publicação WIPO Nº WO 02/00721). A análise da distribuição de tecido do mRNA da subunidade de IL-31RA revelou a expressão em subconjuntos de células T CD4+ e CD8+ ativadas, monócitos de CD14+ e expressão mais fraca em células N CD19+. Além disso, o mRNA foi presente tanto linhagens de célula monocíticas THP-1 em repouso ou ativadas (ATCC Nº TIB-202), U937 (ATCC Nº CRL-1593.2) e HL60 (ATCC Nº CCL-240).

A inibição, neutralização, transdução de sinal bloqueador pelos antagonistas de IL-31 aqui descritos podem ser medidos por vários ensaios conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, os ensaios que medem uma redução na proliferação incluem ensaios para a redução de um corante tal como Azul de Alamar® (AccuMed International, Inc. Westlake,

Ohio), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983); 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5,3-carboximetoxifenil-2H-tetrazólio; hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazólio; e cloreto de cianoditolil-tetrazólio (que são comercialmente disponíveis da Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensaios de mitogênese, tal como a medição da incorporação de ³H-timidina; ensaios de exclusão de corante usando, por exemplo, negro de naftaleno ou azul de triptano; captação de corante usando diacetil fluoresceína; e liberação de cromo. Ver, no geral, Freshney, Culture of
 5 Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3^a ed., Wiley-Liss, 1994, que é aqui incorporada por referência. Além do acima, ver a publicação de patente U.S. publicada número 20030224487, (Sprecher, Cindy *et al.*, 2003) para um exemplo de células BaF3 que expressam IL-31RA e OSMRbeta de tamanho natural.

15 No geral, as citocinas são prognosticadas ter uma estrutura de hélice quatro-alfa, com hélices A, C e D sendo mais importante nas interações de ligando-receptor e são mais altamente conservadas entre os membros da família. Referindo-se à seqüência de aminoácido de IL-31 humana mostrada na SEQ ID NO: 2, o alinhamento de IL-31 humana, IL-3 humana e
 20 seqüências de aminoácido de citocina humana é prognosticado que a hélice A IL-31 é definido pelos resíduos de aminoácido 38-52; hélice B pelos resíduos de aminoácido 83-98; hélice C pelos resíduos de aminoácido 104-117; e hélice D pelos resíduos de aminoácido 137-152; como mostrado na SEQ ID NO: 2. A análise estrutural sugere que a alça A/B é longa, a alça B/C é curta e
 25 a alça C/D é longa. Esta estrutura de alça resulta em uma organização helicoidal para cima-para cima-para baixo-para baixo. Com base na estrutura de feixe de 4-hélices, os resíduos de cisteína dentro de IL-31 que são conservadas correspondem aos resíduos de aminoácido 72, 133 e 147 da SEQ ID NO: 2; e 74, 137 e 151 da SEQ ID NO: 11 aqui descritas. A colocação de

cisteína compatível é outra confirmação da estrutura de feixe de quatro hélice. Também altamente conservado na IL-31 está o resíduo Glu como mostrado na SEQ ID NO: 2 no resíduo 43. Estas hélices de IL-31 podem ser alvos específicos para a inibição, redução ou neutralização pelos anticorpos descritos aqui para bloquear os efeitos da sinalização de IL-31 através do seu receptor cognato.

Com base na comparação entre as seqüências de resíduos conservados de IL-31 humana e de murino foram encontrados nas regiões prognosticadas para codificar hélices alfa C e D. Os polinucleotídeos correspondentes que codificam as regiões de polipeptídeo da IL-31 humana, domínios, motivos, resíduos e seqüências aqui descritas são como mostradas na SEQ ID NO: 1. Estas hélices de IL-31 podem ser alvos específicos para a inibição, redução ou neutralização pelos anticorpos aqui descritos para bloquear os efeitos da sinalização de IL-31 através do seu receptor cognato.

Embora a hélice D seja relativamente conservada entre a IL-31 humana e de murino, a hélice C é a mais conservada. Embora ambas as espécies tenham aminoácidos ácidos predominantes nesta região, as diferenças podem ser responsáveis pela especificidade de espécie em interação entre IL-31 e seu receptor, a IL-31RA que compreende receptores monoméricos, heterodiméricos ou multiméricos. As alças A/B e a hélice B de IL-31 são marginalmente conservadas e a hélice C até a Alça C/D na hélice D é a mais conservada entre as espécies; a conservação através desta região sugere que a mesma é funcionalmente significativa. As hélices D de IL-31 humana e de murino também são conservadas. Os antagonistas do receptor de IL-31RA podem ser planejados através das mutações dentro da hélice D de IL-31. Estas podem incluir a truncagem da proteína a partir do resíduo Thr156 (SEQ ID NO: 2) ou conservação dos resíduos que conferem a ligação do ligando ao receptor, mas diminui a atividade de sinalização.

Os métodos para preparar os polinucleotídeos que codificam

os anticorpos aqui descritos (incluindo DNA e RNA) são bem conhecidos na técnica. O RNA total pode ser preparado usando a extração pelo isotiocianato de guanidínio seguido pela isolamento pela configuração em um gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, Biochemistry **18**: 52-94, 1979). Poli (A)⁺ RNA é
 5 preparado a partir de RNA total usando o método de Aviv e Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 1408-12, 1972). O DNA complementar (cDNA) é preparado a partir de poli(A)⁺ RNA usando métodos conhecidos. Na alternativa, o DNA genômico pode ser isolado. Os polinucleotídeos que codificam anticorpos IL-31 são depois identificados e isolados, por exemplo,
 10 pela hibridização ou PCR.

A sequência de polinucleotídeo para o ortólogo de camundongo de IL-31 foi identificada e é mostrada na SEQ ID NO: 3. A sequência madura para a IL-31 de camundongo putativamente começa em Met₁, como mostrado na SEQ ID NO: 4, que corresponde a Met₁, como
 15 mostrado na SEQ ID NO: 2, na sequência humana. A análise de tecido revelou que a expressão de IL-31 de camundongo é encontrada em testículos, cérebro, células CD90+, células prostáticas, glândulas salivares e pele. Outra análise de seqüenciamento de terminal N de IL-31 purificada a partir de células 293T mostrou um terminal N no resíduo 31 (Ala) como mostrado na
 20 SEQ ID NO: 4, com o polipeptídeo maduro compreendido de resíduos de aminoácido 31 (Ala) a 163 (Cys) (como mostrada na SEQ ID NO: 4).

Um perfil de hidrofiliidade Hopp/Woods da sequência de proteína IL-31 como mostrado na SEQ ID NO: 2 pode ser gerado (Hopp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. **78**: 3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Met. **88**: 1-
 25 18, 1986 e Triquier *et al.*, Protein Engineering **11**: 153-169, 1998). O perfil está fundamentado em uma janela de seis resíduos deslizante. Os resíduos G, S e T encobertos e os resíduos H, Y e W expostos foram ignorados. Por exemplo, na IL-31 humana, as regiões hidrofílicas incluem os resíduos de aminoácido de 54 a 59 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 129 a

134 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 53 a 58 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 35 a 40 da SEQ ID NO: 2 e os resíduos de aminoácido de 33 a 38 da SEQ ID NO: 2. Por exemplo, na IL-31 de camundongo, as regiões hidrofílicas incluem os resíduos de aminoácido de 34 a 39 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 46 a 51 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 131 a 136 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 158 a 163 da SEQ ID NO: 11 e os resíduos de aminoácido de 157 a 162 da SEQ ID NO: 11.

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que a hidrofílicidade ou hidrofobicidade serão levadas em conta quando do planejamento de modificações na sequência de aminoácido de um polipeptídeo de IL-31, de modo a não romper o perfil estrutural e biológico global. De interesse particular para a substituição são os resíduos hidrofóbicos selecionados do grupo que consiste de Val, Leu e Ile ou do grupo que consiste de Met, Gly, Ser, Ala, Tyr e Trp. Por exemplo, os resíduos tolerantes de substituição poderiam incluir Val, Leu e Ile ou o grupo que consiste dos resíduos Met, Gly, Ser, Ala, Tyr e Trp como mostrado na SEQ ID NO: 2. Os Resíduos de cisteína conservados nas posições dentro da SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 11, serão relativamente intolerantes de substituição.

A presente invenção também inclui anticorpos que se ligam a fragmentos funcionais de polipeptídeos e moléculas de ácido nucleico de IL-31 que codificam tais fragmentos funcionais. Uma IL-31 “funcional” ou fragmento deste como aqui definido é caracterizado pela sua atividade proliferativa ou de diferenciação, pela sua capacidade para induzir ou inibir funções de célula especializadas ou pela sua capacidade para ligar especificamente a um anticorpo anti-IL-31 ou IL-31RA ou anticorpo ou heterodímeros IL-31RA/OSMRbeta destes receptores (solúveis ou imobilizados). Como previamente aqui descrito, IL-31 é caracterizado por uma estrutura de feixe helicoidal quádruplo que compreende a hélice A

(resíduos de aminoácido 38 a 52), hélice B (resíduos de aminoácido de 83 a 98), hélice C (resíduos de aminoácido de 104 a 117) e hélice D (resíduos de aminoácido de 137 a 152), como mostrado na SEQ ID NO: 2. Assim, a presente invenção fornece ainda proteínas de fusão que abrangem: (a) moléculas de polipeptídeo que compreendem uma ou mais das hélices descritas acima; e (b) fragmentos funcionais que compreendem uma ou mais destas hélices. A outra porção de polipeptídeo da proteína de fusão pode ser contribuída por uma outra citocina de feixe helicoidal quádruplo, tal como IL-15, IL-2, IL-4 e GM-CSF ou por um peptídeo de sinal secretor não nativo e/ou um não relacionado que facilite a secreção da proteína de fusão.

A presente invenção também fornece anticorpos que se ligam aos fragmentos de polipeptídeo ou peptídeos que compreendem uma porção que carrega epítipo de um polipeptídeo de IL-31 aqui descrito. Tais fragmentos ou peptídeos podem compreender um “epítipo imunogênico,” que é uma parte de uma proteína que evoca uma resposta de anticorpo quando a proteína inteira é usada como um imunógeno. Os peptídeos que portam epítipo imunogênico podem ser identificados usando métodos padrão (ver, por exemplo, Geysen *et al.*, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 81: 3998 (1983)). A ligação dos anticorpos para estes fragmentos funcionais resulta na inibição, bloqueio, neutralização e/ou redução na transdução de sinal de IL-31 no seu receptor cognato.

Ao contrário, os fragmentos de polipeptídeo ou peptídeos podem compreender um “epítipo antigênico,” que é uma região de uma molécula de proteína à qual um anticorpo pode especificamente ligar-se. Certos epítopos consistem de um trecho linear ou contíguo de aminoácidos e a antigenicidade de um tal epítipo não é rompida pelos agentes desnaturantes. É conhecido na técnica que os peptídeos sintéticos relativamente curtos que podem imitar epítopos de uma proteína podem ser usados para estimular a produção de anticorpos contra a proteína (ver, por exemplo, Sutcliffe *et al.*,

Science 219: 660 (1983)). Conseqüentemente, os peptídeos e polipeptídeos que portam epítipo antigênico da presente invenção são úteis para incitar anticorpos (por exemplo, anticorpos neutralizadores) que se ligam com os polipeptídeos aqui descritos. Os perfis de hidrofiliidade de Hopp/Woods podem ser usados para determinar regiões que têm o potencial mais antigênico (Hopp *et al.*, 1981, *ibid.* e Hopp, 1986, *ibid.*). Por exemplo, na IL-31 humana, as regiões hidrofílicas incluem resíduos de aminoácido de 54 a 59 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 129 a 134 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 53 a 58 da SEQ ID NO: 2, os resíduos de aminoácido de 35 a 40 da SEQ ID NO: 2 e os resíduos de aminoácido de 33 a 38 da SEQ ID NO: 2. Por exemplo, na IL-31 de camundongo, as regiões hidrofílicas incluem resíduos de aminoácido de 34 a 39 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 46 a 51 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 131 a 136 da SEQ ID NO: 11, os resíduos de aminoácido de 158 a 163 da SEQ ID NO: 11 e os resíduos de aminoácido de 157 a 162 da SEQ ID NO: 11.

Os peptídeos e polipeptídeos que portam epítipo antigênico preferivelmente contêm pelo menos de quatro a dez aminoácidos, pelo menos de dez a catorze aminoácidos ou de cerca de catorze a cerca de trinta aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4. Tais peptídeos e polipeptídeos que portam epítipo podem ser produzidos pela fragmentação de um polipeptídeo de IL-31 ou pela síntese química de peptídeo, como aqui descrita. Além disso, os epítopos podem ser selecionados pela demonstração de fago de bibliotecas de peptídeo aleatórias (ver, por exemplo, Lane e Stefen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268 (1993); e Cortese *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616 (1996)). Os métodos padrão para identificar epítopos e produzir anticorpos a partir de peptídeos pequenos que compreendem um epítipo são descritos, por exemplo, por Mole, "Epitope Mapping," em Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105 a 116 (The Humana

Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," em Monoclonals Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter e Ladyman (eds.), páginas 60 a 84 (Cambridge University Press 1995) e Coligan *et al.* (eds.), Current Protocols in Immunology, páginas 9.3.1 a 9.3.5 e páginas 9.4.1 a 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

A atividade dos anticorpos como aqui descritos pode ser medida pela sua capacidade para inibir ou reduzir a proliferação usando uma variedade de ensaios que medem a proliferação de e/ou ligação às células que expressam o receptor de IL-31RA. De interesse particular são as mudanças nas células dependentes de IL-31. As linhagens de célula adequadas a serem engendradas para serem dependentes de IL-31 incluem a linhagem de célula BaF3 dependente de IL-3 (Palacios e Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), FDC-P1 (Hapel *et al.*, Blood 64: 786-790, 1984) e MO7e (Kiss *et al.*, Leukemia 7: 235-240, 1993). As linhagens de célula dependentes do fator de crescimento podem ser estabelecidas de acordo com métodos publicados (por exemplo Greenberger *et al.*, Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexter *et al.*, em Baum *et al.* Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

A atividade dos anticorpos anti-IL-31 aqui descritos pode ser medida por um microfisiômetro biosensor com base em silício que mede a taxa de acidificação extracelular ou a excreção de próton associadas com a ligação de receptor e as respostas celulares fisiológicas subsequentes. Um dispositivo exemplar é o Microfisiômetro Cytosensor[®] fabricado pela Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Uma variedade de respostas celulares, tais como proliferação de célula, transporte de íon, produção de energia, resposta inflamatória, ativação regulatória e de receptor e outras, podem ser medidos por este método. Ver, por exemplo, McConnell, H. M. *et al.*, Science

257: 1906-1912, 1992; Pitchford, S. *et al.*, Met. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. *et al.*, J. Immunol. Met. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998.

Os antagonistas também são úteis como reagentes de pesquisa para caracterizar sítios de interação de ligando-receptor. Os antagonistas são úteis para inibir a expansão, proliferação, ativação e/ou diferenciação de células envolvidas na regulação da hematopoiese. Os inibidores da atividade de IL-31 (antagonistas de IL-31) incluem anticorpos anti-IL-31 e receptores de IL-31 solúveis, assim como outros agentes peptídicos e não peptídicos (incluindo ribozimas).

A inibição da atividade de IL-31 pode ser medida por vários ensaios. Além daqueles ensaios aqui divulgados, amostras podem ser testadas quanto a inibição da atividade de IL-31 dentro de uma variedade de ensaios planejados para medir a ligação de receptor, a estimulação/inibição de respostas celulares dependentes de IL-31 ou proliferação de células que expressam o receptor de IL-31RA.

Um polipeptídeo de ligação de IL-31 também pode ser usado para a purificação de ligando. O polipeptídeo é imobilizado em um suporte sólido, tal como pérolas de agarose, agarose reticulada, vidro, resinas celulósicas, resinas com base em sílica, poliestireno, poliacrilamida reticulada ou materiais equivalentes que são estáveis sob as condições de uso. Os métodos para a ligação de polipeptídeos aos suportes sólidos são conhecidos na técnica e incluem a química da amina, ativação pelo brometo de cianogênio, ativação pela N-hidroxissuccinimida, ativação pelo epóxido, ativação pela sulfidril e ativação pela hidrazida. O meio resultante no geral será configurado na forma de uma coluna e os fluidos contendo ligando são passados através da coluna uma ou mais vezes para permitir que o ligando se ligue ao polipeptídeo receptor. O ligando é depois eluído usando mudanças na concentração salina, agentes caotrópicos (guanidina HCl) ou pH para romper

a ligação de ligando do receptor.

Um sistema de ensaio que usa um receptor da ligação de ligando (ou um anticorpo, um membro de um par de complemento/anti-complemento) ou um fragmento de ligação deste e um instrumento biossensor comercialmente disponível (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) pode ser vantajosamente utilizado. Tal receptor, anticorpo, membro de um par de complemento/anti-complemento ou fragmento é imobilizado sobre a superfície de um chip receptor. O uso deste instrumento é divulgado por Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-40, 1991 e Cunningham e Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-63, 1993. Um receptor, anticorpo, membro ou fragmento são covalentemente ligados, usando a química da amina ou sulfidril, às fibras de dextrano que são ligadas a películas de ouro dentro da célula de fluxo. Uma amostra de teste é passada através da célula. Se um ligando, epítipo ou membro oposto do par complemento/anti-complemento estiverem presentes na amostra, os mesmos ligar-se-ão ao receptor, anticorpo ou membro imobilizados, respectivamente, causando uma mudança no índice refrativo do meio, que é detectada como uma mudança na ressonância de plasma de superfície da película de ouro. Este sistema permite a determinação de valores dentro e fora, a partir dos quais a afinidade de ligação pode ser calculada e a avaliação da estequiometria de ligação. Alternativamente, a ligação de ligando/receptor pode ser analisada usando a tecnologia de SELDI(TM) (CIPHERGEN, Inc., Palo Alto, CA).

Os anticorpos IL-31 podem ser usados para bloquear a ação biológica de IL-31 pró-inflamatória e são úteis como produtos terapêuticos anti-inflamatórios em uma variedade de doenças como aqui descritas. Uma pessoa de habilidade na técnica reconheceria que polipeptídeos antigênicos, que portam epítipo contêm uma seqüência de pelo menos 6, preferivelmente pelo menos 9 e mais preferivelmente pelo menos 15 a cerca de 30 resíduos de aminoácido contíguos de um polipeptídeo IL-31 (por exemplo, a SEQ ID NO:

2). Os polipeptídeos que compreendem uma porção maior de um polipeptídeo de IL-31, isto é, de 30 a 100 resíduos até o comprimento total da sequência de aminoácido são incluídos. Antígenos ou epítomos imunogênicos também podem incluir rótulos, adjuvantes, veículos e carregadores ligados, como aqui descritos. Os antígenos adequados incluem o polipeptídeo IL-31 codificado pela SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 24 ao aminoácido número 164 ou um fragmento deste. Outros antígenos adequados incluem, o comprimento completo e a IL-31 madura, hélices A a D e hélices individuais ou múltiplas A, B, C e D, da estrutura de feixe helicoidal quádruplo de IL-31, como aqui descrito. Os peptídeos preferidos para o uso como antígenos são peptídeos hidrofílicos tais como aqueles prognosticados por uma pessoa de habilidade na técnica a partir de uma plotagem de hidrofobicidade, como aqui descritos, por exemplo, os resíduos de aminoácido de 114 a 119, 101 a 105, 126 a 131, 113 a 118 e 158 a 162 da SEQ ID NO: 2; e os resíduos de aminoácido de 34 a 39, 46 a 51, 131 a 136, 158 a 163 e 157 a 162 da SEQ ID NO: 11. Além disso, epítomos antigênicos de IL-31 como prognosticados por uma plotagem de Jameson-Wolf, por exemplo, usando DNASTAR Protean program (DNASTAR, Inc., Madison, WI) servem como antígenos preferidos e são facilmente determinados por uma pessoa de habilidade na técnica.

Os anticorpos de uma resposta imune gerada pela inoculação de um animal com estes antígenos podem ser isolados e purificados como aqui descritos. Os métodos para preparar e isolar anticorpos policlonais e monoclonais são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Current Protocols in Immunology, Cooligan, *et al.* (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, NY, 1989; e Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

Como estaria evidente a uma pessoa de habilidade comum na

técnica, os anticorpos policlonais podem ser gerados a partir da inoculação de uma variedade de animais de sangue quente tais como cavalos vacas, cabras, ovelhas, cães, galinhas, coelhos, camundongos e ratos com um polipeptídeo de IL-31 ou um fragmento deste. A imunogenicidade de um polipeptídeo de IL-31 pode ser aumentada através do uso de um adjuvante, tal como alúmen (hidróxido de alumínio) ou adjuvante completo ou incompleto de Freund. Os polipeptídeos úteis para a imunização também incluem polipeptídeos de fusão, tais como as fusões de IL-31 ou uma porção desta com um polipeptídeo de imunoglobulina ou com proteína de ligação de maltose. O imunógeno de polipeptídeo pode ser uma molécula de tamanho natural ou uma porção desta. Se a porção de polipeptídeo é “equivalente a hapteno”, tal porção pode ser vantajosamente unida ou ligada a um carregador macromolecular (tal como a hemocianina do lapa buraco de fechadura (KLH), albumina sérica bovina (BSA) ou toxóide do tétano) para imunização.

Os anticorpos são considerados estar especificamente ligados se: 1) eles exibem um nível de limiar de atividade de ligação e 2) eles não reagem cruzado de modo significativo com moléculas de polipeptídeo relacionadas. Um nível de limiar de ligação é determinado se anticorpos anti-IL-31 aqui ligam a um polipeptídeo, peptídeo ou epítipo de IL-31 com uma afinidade pelo menos 10 vezes maior do que a afinidade de ligação ao polipeptídeo de controle (não IL-31). É preferido que os anticorpos exibam uma afinidade de ligação (K_a) de 10^6 M^{-1} ou maior, preferivelmente 10^7 M^{-1} ou maior, mais preferivelmente 10^8 M^{-1} ou maior e o mais preferivelmente 10^9 M^{-1} ou maior. A afinidade de ligação de um anticorpo pode ser facilmente determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica, por exemplo, pela análise de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Se os anticorpos anti-IL-31 não reagem cruzado de modo significativo com as moléculas de polipeptídeo relacionadas é mostrado, por

exemplo, pelo anticorpo detectando polipeptídeo de IL-31 mas não polipeptídeos relacionados conhecidos usando uma análise de Western blot padrão (Ausubel *et al.*, *ibid.*). Os exemplos de polipeptídeos relacionados conhecidos são aqueles divulgados na técnica anterior, tal como ortólogos e parálogos conhecidos e membros conhecidos similares de uma família de proteína. A triagem também pode ser feita usando polipeptídeos de IL-31 e mutante de IL-31 não humanos. Além disso, os anticorpos podem ser “triados contra” polipeptídeos relacionados conhecidos, para isolar uma população que especificamente se liga aos polipeptídeos de IL-31. Por exemplo, anticorpos incitados a IL-31 são adsorvidos pelos polipeptídeos relacionados aderidos à matriz insolúvel; os anticorpos específicos para IL-31 fluíram através da matriz sob as condições de tampão apropriadas. A triagem permite a isolamento de anticorpos policlonais e monoclonais não reativos cruzados com os polipeptídeos intimamente relacionados conhecidos (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow e Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, *et al.* (eds.), National Institutes of Health, John Wiley e Sons, Inc., 1995). A triagem e isolamento de anticorpos específicos são bem conhecidas na técnica. Ver, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonals Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984. Especificamente a ligação de anticorpos anti-IL-31 pode ser detectada por vários métodos na técnica e divulgados abaixo.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados, por exemplo, pela imunização de Ratos Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), com o polipeptídeo de IL-31 humano recombinante maduro purificado (resíduos de aminoácido de 27 (Leu) a 167 (Thr) da SEQ ID NO: 2) ou o ortólogo de camundongo, produzidos a partir

dos sistemas de expressão aqui listados. Os ratos são cada um administrados com uma injeção intraperitoneal (IP) inicial de 100 µg da proteína de IL-31 recombinante humana purificada em Adjuvante de Freund Completo (Pierce, Rockford, IL) seguida por injeções IP de reforço de 50 µg da proteína recombinante purificada em Adjuvante de Freund Incompleto a cada duas semanas. Sete a dez dias depois da administração da terceira injeção de reforço, os animais são sangrados e o soro é coletado.

As amostras de soro de rato específico da IL-31 humana amostras são caracterizadas pelo ELISA quanto ao título para o alvo de anticorpo específico da IL-31 humana biotinilado.

As células de esplenócitos e nódulo linfático são colhidas de 2 ratos de título alto e fundidas às células de mieloma SP2/0 (camundongo) usando PEG 1500 em dois procedimentos de fusão separados (razão de fusão de 4:1, células de esplenócitos para mieloma, “Antibodies A Laboratory Manual, E. Harlow e D. Lane, Cold Spring Harbor Press). A seguir dos 10 dias de cultivo pós-fusão, as reuniões de hibridoma que produz o anticorpo específico são identificadas pelo ELISA. As reuniões de hibridoma positivas em ambos os protocolos de ELISA são ainda analisadas quanto a sua capacidade para bloquear ou reduzir a ligação da atividade de receptor (“ensaio de neutralização”) de IL-31 recombinante purificada.

As reuniões de hibridoma que produzem resultados positivos pelo ELISA apenas ou ELISA e o “ensaio de neutralização” são clonados pelo menos duas vezes pela diluição limitante.

Os anticorpos monoclonais purificados a partir do meio de cultura de tecido são caracterizados quanto a sua utilidade em um ELISA para a determinação quantitativa de IL-31 humana recombinante e nativa. Os anticorpos são selecionados e um ensaio quantitativo é desenvolvido.

Os anticorpos monoclonais purificados a partir dos meios de cultura de tecido são caracterizados quanto a sua capacidade para bloquear ou

reduzir a atividade de ligação do receptor (“ensaio de neutralização”) de huIL-31 recombinante purificada em células BaF3/MPL-IL-31. Vários anticorpos monoclonais “neutralizantes” são identificados desta maneira. Os hibridomas que expressam os anticorpos neutralizadores monoclonais para a IL-31 humana descritos podem ser depois depositados com o depósito de patente American Type Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas VA) como depósitos originais sob o Tratado de Budapeste.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados pela imunização de Ratos Lewis (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), com a proteína de fusão clivada e IL-31 purificada recombinante. Os ratos são cada um administrados com uma injeção intraperitoneal (IP) inicial de 100 µg da proteína de fusão purificada recombinante em Adjuvante de Freund Completo (Pierce, Rockford, IL) seguido por injeções IP de reforço de 50 µg da proteína recombinante purificada em Adjuvante de Freund Incompleto a cada duas semanas por quatro semanas. A seguir das quatro primeiras semanas de imunizações, injeções IP de reforço de 50 µg da proteína recombinante purificada clivada ligada à proteína carregadora de hemocianina do lapa buraco de fechadura (KLH, Pierce, Rockford, IL) em Adjuvante de Freund Incompleto são administrados a cada duas semanas por quatro semanas. De sete a dez dias depois da administração da quarta injeção de reforço, os animais são sangrados e o soro foi coletado. As amostras de soro de rato específicas de IL-31 são caracterizadas pelo ELISA usando 500 ng/ml da proteína recombinante purificada de fusão IL-31-Fc como o alvo de anticorpo específico e uma proteína de fusão não relacionada como um alvo de anticorpo não específico. Os esplenócitos são colhidos de um ou mais ratos de título alto e fundidos às células de mieloma SP2/0 (camundongo) em um protocolo de fusão mediado pelo PEG otimizado (Rockland Immunochemicals). Os seguintes 12 dias de cultivo pós fusão, as reuniões de hibridoma que produzem anticorpo específicas são identificadas pelo ELISA

usando 500 ng/ml cada da proteína de fusão purificada recombinante de IL-31 como o alvo de anticorpo específico e uma proteína de fusão não relacionada como um alvo de anticorpo não específico. As reuniões de hibridoma positivas apenas para o alvo de anticorpo específico são analisadas ainda
5 quanto a sua capacidade para bloquear ou reduzir a atividade de ligação de receptor (“ensaio de neutralização”) de huIL-31 recombinante em células BaF3/MPL-IL-31 e uma capacidade para ligar por intermédio de análise FACS como alvo de anticorpo. As reuniões de hibridoma que produzem um resultado positivo específico no ensaio de ELISA e resultados positivos no
10 FACS ou “ensaio de neutralização” são clonados pelo menos duas vezes pela diluição limitante.

Cinco hibridomas anti-camundongo de rato foram gerados em uma maneira similar e foram dados as seguintes designações de clone: clone 271.9.4.2.6, clone 271.26.6.6.1, clone 271.33.1.2.2, clone 271.33.3.2.1 e clone
15 271.39.4.6.5. Ver o Exemplo 1. Os anticorpos monoclonais produzidos por estes clones foram caracterizados em vários modos incluindo compartimentação (isto é, a determinação se cada anticorpo pode inibir a ligação de qualquer outra ligação), afinidade relativa e neutralização. Os anticorpos monoclonais parecem cair em dois compartimentos separados com
20 a ligação do clone 271.33.3.2.1 a um epítipo separado além dos outros quatro. A afinidade de ligação relativa para quatro destes anticorpos monoclonais está descrita no Exemplo 14.

A afinidade de ligação dos anticorpos monoclonais pode ser gerada. O anticorpo específico de IgG-Fc gama anti-Rato de cabra (Jackson) é
25 imobilizado em um chip CM5 Biacore. O ensaio é otimizado para ligar cada mAb na superfície de captura anti-Rato e depois uma série de concentração de IL-31 é injetada através de mAb para ver a associação (K_a) e a dissociação (K_d). Depois de cada rodada, a superfície é regenerada de volta para o Anticorpo anti-Rato com 2 injeções de 20 mM de HCl. Os dados são gerados

para cada um e o software de avaliação (software BIAevaluation versão 3.2, Pharmacia BIAcore, Uppsala, Suécia) é usado para avaliar as cinéticas da ligação de anticorpo anti-IL-31 à proteína IL-31.

mAbs anti-IL-31 humana de murino podem ser gerados como segue. Camundongos silenciados em IL-31 de seis a doze semanas de idade são imunizados pela injeção intraperitoneal com 25 a 50 µg de proteína IL-31 humana-muFc solúvel) misturados 1:1 (v:v) com adjuvante Ribi (Sigma) em um programa bi-semanal. Sete a dez dias a seguir da terceira imunização, as amostras de sangue são tiradas por intermédio da sangria retroorbital, o soro colhido e avaliado quanto a sua capacidade para inibir a ligação de IL-31 em ensaios de neutralização (por exemplo, aqui descritos) e para tingir células 293 transfectadas versus não IL-31 transfectadas com IL-31 em um ensaio de tingimento de FACS. Os camundongos continuaram a ser imunizados e as amostras de sangue coletadas e avaliadas como descrito acima até que os títulos de neutralização atingissem um platô. Neste momento, os camundongos com os títulos de neutralização mais altos são injetados intravascularmente com 25 a 50 µg de4 proteína IL-31-Fc solúvel em PBS. Três dias mais tarde, o baço e linfonodos destes camundongos são colhidos e usados para a geração de hibridoma, por exemplo usando células de mieloma de camundongo (P3-X63-Ag8.653.3.12.11) ou outras linhagens de célula apropriadas na técnica, usando métodos padrão conhecidos na técnica (por exemplo, ver Kearney, J. F. *et al.*, J Immunol. 123: 1548-50, 1979; e Lane, R. D. J Immunol Methods 81: 223-8, 1985).

A triagem primária pode ser realizada nos sobrenadantes de hibridoma em 8 a 10 dias após a fusão quanto a sua capacidade para ligar a proteína IL-31-muFc pelo ELISA usando reagentes da segunda etapa anti-camundongo de cabra conjugado a HRP capa e anti-cadeia leve lambda para identificar anticorpos de camundongo ligados.

A confirmação bioquímica de que a molécula alvo, IL-31,

reconhecida pelos mAbs anti-IL-31 putativo é de fato IL-31 é realizada pela imunoprecipitação padrão seguida pela análise de SDS-PAGE ou procedimentos de western blotting, ambos utilizando preparações de membrana solúvel de células IL-31 transfectadas versus Baf3 não transfectadas. Os mAbs são testados quanto a sua capacidade para imunoprecipitar especificamente ou western blot a proteína IL-31-muFc solúvel.

Os anticorpos monoclonais purificados a partir dos meios de cultura de tecido foram caracterizados quanto a sua capacidade para bloquear ou inibir a capacidade de IL-31 para ligar ao seu receptor em um ensaio de neutralização. Vinte anticorpos monoclonais “neutralizadores” foram identificados desta maneira. Dez destes foram identificados como “bons neutralizadores” depois da primeira rodada de clonagem: o clone 292.72.3, clone 292.118.6, clone 292.63.5, clone 292.64.6, clone 292.84.1, clone 292.109.4, clone 292.12.3, clone 292.51.5, clone 292.39.5 e clone 292.105.4. Os outros dez têm as seguintes designações de clone depois da primeira rodada de clonagem: clone 294.35.2, clone 294.146.5, clone 292.152.4, clone 292.154.4, clone 294.154.5, clone 294.35.3, clone 291.78.4, clone 294.155.6, clone 294.158.5, clone 294.163.2 e clone 294.144.3.

Os anticorpos monoclonais específicos foram coletados através de uma segunda rodada de clonagem e, mais uma vez, caracterizados quanto a sua capacidade para bloquear ou inibir a capacidade da IL-31 para ligar ao seu receptor em um ensaio de neutralização. As designações de clone depois da segunda rodada de clonagem quanto aos “bons neutralizadores” são: clone 292.12.3.1, clone 292.63.5.3, clone 292.72.3.1, clone 292.84.1.6, clone 292.118.6.4, clone 292.64.6.5.5, clone 292.39.5.3, clone 292.51.5.2, clone 292.109.4.4 e clone 292.105.4.1. Seis dos outros dez têm as seguintes designações de clone: clone 292.152.4.1, clone 294.158.5.2, clone 294.32.2.6.3, clone 294.144.3.5, clone 294.154.5.3 e clone 294.163.2.1.

Os hibridomas que expressam os anticorpos neutralizadores monoclonais para a IL-31 humana descritos acima foram depositados com o depósito de patente da American Type Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas VA) como depósitos originais sob o Tratado de Budapeste e foram dados os seguintes N^{os} de Acesso ATCC: clone 292.12.3.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815); clone 292.72.3.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816); clone 292.63.5.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829); clone 292.118.6.4 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830); clone 294.163.2.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831); clone 292.84.1.6 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871); clone 294.35.2.6.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872); clone 294.154.5.6 Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875); e clone 294.144.3.5 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873).

Um hibridoma que expressa os anticorpos neutralizadores monoclonais para a IL-31 camundongo aqui descritos foi depositado com o depósito de patente da American Type Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas VA) como um depósito original sob o Tratado de Budapeste e foi dado o seguinte N^o de Acesso ATCC: clone 271.26.6.6.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6874)

Os anticorpos monoclonais produzidos por estes clones de hibridoma podem ser cultivados em um meio de cultivo de 90% de meio de Dulbecco modificado de Iscove com 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 10% de Soro de Clone Fetal I (Hyclone Laboratories). Os clones podem ser propagados partindo-se de culturas a 2×10^5 células/ml e mantendo entre 1×10^5 e 5×10^5 célula/ml a 37°C e 5 a 6% de CO₂. As células podem ser adaptadas às condições isentas de soro nas transferências subseqüentes. As células que são congeladas são armazenadas em 90% de soro, 10% de DMSO e armazenadas na fase de

vapor do congelador de nitrogênio líquido.

Os anticorpos monoclonais em meios de cultura de tecido são caracterizados quanto a sua capacidade para bloquear, inibir, prevenir ou reduzir a ligação de receptor quando cultivado na presença da proteína de IL-31 humana recombinante purificada. Por exemplo, os anticorpos monoclonais produzidos por estes clones foram caracterizados em vários modos incluindo compartimentação (isto é, a determinação se cada anticorpo poderia inibir a ligação de qualquer outra ligação), a afinidade e neutralização relativas. Os dez bons anticorpos neutralizadores parecem estar no mesmo compartimento, com o outro agrupamento de anticorpos monoclonais em três compartimentos separados. Além disso, oito dos bons anticorpos neutralizadores são isótipos de IgG1 e os outros dois são isótipos de IgG2a.

Os anticorpos monoclonais de sobrenadantes de hibridoma foram capturados usando Fc pAb anti murino de cabra e a afinidade de ligação aparente (EC50) de IL31 biotinilada foi medida. Sob estas condições de ensaio, os bons neutralizadores têm os valores EC50 mais baixos e comparáveis de ~4 ng/ml de Bt-IL31. A afinidade aparente dos neutralizadores fracos transpõem uma faixa de ~10 ng/ml a 236 ng/ml de Bt-IL31.

Os anticorpos monoclonais gerados pelos métodos aqui descritos podem ser testados quanto a neutralização por uma variedade de métodos. Por exemplo o ensaio da luciferase como descrito no pedido de patente U.S. publicado (Ver, a publicação número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003) pode ser usado. Além disso, a neutralização pode ser testada pela medição de uma diminuição na produção de quimiocinas pró-inflamatórias tais como TARC e MDC a partir de culturas de queratinócitos na presença de ligando e do anticorpo monoclonal. A neutralização também pode ser medida pelos modelos *in vivo* aqui descrita.

Em uma forma de realização, os anticorpos da presente

invenção são fragmentos de anticorpo que liga antígeno humano da presente invenção e incluem, mas não são limitados a, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, Fvs ligados a dissulfeto (sdFv) e fragmentos que compreendem um domínio VL ou VH. Os

5 fragmentos de anticorpo que ligam antígeno, incluindo anticorpos de cadeia única, podem compreender a(s) região(ões) variável(is) sozinha(s) ou em combinação com a totalidade ou uma porção das seguintes: região de dobradiça, domínios C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Também incluídos na invenção estão os

10 fragmentos de ligação de antígeno que compreendem também qualquer combinação de região(ões) variável(is) com uma região de fechadura, domínios C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}.

Em uma outra forma de realização, os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou de multiespecificidade maior. Os anticorpos multiespecíficos podem ser

15 específicos para epítopos diferentes de um polipeptídeo da presente invenção ou podem ser específicos tanto para um polipeptídeo da presente invenção assim como para um epítipo heterólogo, tal como um polipeptídeo heterólogo ou material de suporte sólido. Ver, por exemplo, as publicações PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J.

20 Immunol. 147: 60-69 (1991); Pat. U.S. N^{os} 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819; Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

A presente invenção também inclui anticorpos geneticamente alterados que são funcionalmente equivalentes aos anticorpos acima descritos. Os anticorpos modificados que fornecem estabilidade e/ou eficácia

25 terapêutica melhoradas são preferidos. Os exemplos de anticorpos modificados incluem aqueles com substituições conservativas de resíduos de aminoácido e uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não alteram de modo significativamente nocivo a utilidade da ligação de antígeno. As substituições podem variar de mudar ou modificar um ou mais resíduos de

aminoácido para o replanejamento completo de uma região contanto que a utilidade terapêutica seja mantida. Os anticorpos da presente invenção podem ser modificadas pós translacionalmente (por exemplo, acetilação e fosforilação) ou podem ser sinteticamente modificados (por exemplo, a
5 ligação de um grupo de rotulação).

Os anticorpos geneticamente alterados também incluem anticorpos quiméricos que derivaram dos anticorpos anti-IL-31. Os anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável derivada de um camundongo ou rato e uma região constante derivada de um ser humano de modo que o
10 anticorpo quimérico tenha uma meia vida mais longa e seja menos imunogênico quando administrado a um paciente humano. O método de fabricar anticorpos quiméricos é conhecido na técnica. As regiões variáveis destes anticorpos podem ser conectadas com uma região constante de uma IgG humana para formar o anticorpo quimérico desejado.

Os anticorpos anti-IL-31 geneticamente alterados usados na presente invenção incluem a versão humanizada dos anticorpos aqui descritos. Os anticorpos humanizados compreendendo CDRs de uma imunoglobulina doadora de camundongo e estruturas de cadeia pesada e cadeia leve de uma imunoglobulina aceitadora humana. O método de fabricar anticorpo
20 humanizado é divulgado nas Pat. U.S. N^{os} 5.301.101; 5.585.089, 5.693.762 e 6.180.370 (cada uma das quais é incorporada por referência em sua totalidade). As CDRs destes anticorpos podem ser depois enxertadas em qualquer estrutura humana selecionada, que seja conhecida na técnica, para gerar o anticorpo humanizado desejado.

Os anticorpos da presente invenção podem ser descritos ou especificados em termos do(s) epítipo(s) ou porção(ões) de um polipeptídeo da presente invenção que eles reconhecem ou especificamente se ligam. O(s) epítipo(s) ou porção(ões) de polipeptídeo podem ser especificados como aqui descritos, por exemplo, pelas posições de terminal N e terminal C, pelo

tamanho em resíduos de aminoácido contíguos ou listados nas Tabelas e FIGS. Os anticorpos que especificamente se ligam a qualquer epítopo ou polipeptídeo da presente invenção também podem ser excluídos. Portanto, a presente invenção inclui anticorpos que especificamente se ligam aos polipeptídeos da presente invenção e permitem a exclusão dos mesmos.

A invenção também fornece anticorpos que competitivamente inibem a ligação de um anticorpo monoclonal a um polipeptídeo da invenção, preferivelmente o polipeptídeo da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4. A inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, usando os ensaios de ligação competitiva aqui descritos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo competitivamente inibe a ligação de um anticorpo monoclonal da invenção em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60% ou pelo menos 50% ao polipeptídeo da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4.

A invenção também fornece anticorpos que competitivamente inibem a ligação de um anticorpo a um epítopo da invenção como determinado por qualquer método conhecido na técnica para determinar a ligação competitiva, por exemplo, os imunoenaios aqui descritos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo competitivamente inibe a ligação ao epítopo em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60% ou pelo menos 50%.

Os anticorpos da presente invenção incluem derivados que são modificados, isto é, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo tal que a ligação covalente não impeça o anticorpo de gerar uma resposta anti-idiotípica. Por exemplo, mas não por via de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, pela glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação pelos grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma

de numerosas modificações químicas podem ser realizadas pelas técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas à clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

Os anticorpos da presente invenção também abrangem anticorpos ou fragmentos destes que têm meias vidas (por exemplo, meias vidas séricas) em um mamífero, preferivelmente um ser humano, de mais do que 15 dias, preferivelmente mais do que 20 dias, mais do que 25 dias, mais do que 30 dias, mais do que 35 dias, mais do que 40 dias, mais do que 45 dias, mais do que 2 meses, mais do que 3 meses, mais do que 4 meses ou mais do que 5 meses. As meias vidas aumentadas dos anticorpos da presente invenção ou fragmentos destes em um mamífero, preferivelmente um ser humano, resulta em um título sérico mais alto dos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo no mamífero e assim, reduzir a frequência da administração dos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo e/ou reduzir a concentração dos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo a serem administrados.

Os anticorpos ou fragmentos destes tendo meias vidas *in vivo* aumentadas podem ser gerados pelas técnicas conhecidas por aqueles de habilidade na técnica. Por exemplo, anticorpos ou fragmentos destes com meias vidas *in vivo* aumentadas podem ser gerados pela modificação (por exemplo, substituição, deleção ou adição) de resíduos de aminoácido identificados como envolvidos na interação entre o domínio Fc e o receptor FcRn (ver, por exemplo, Publicação Internacional N^{os} WO 97/34631 e WO 02/060919, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades). Os anticorpos ou fragmentos destes com meias vidas *in vivo* aumentadas podem ser geradas pela ligação aos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo de moléculas poliméricas tais como polietileno glicol (PEG) de peso molecular alto. O PEG pode ser ligado aos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo

com ou sem um ligador multifuncional através da conjugação específica de sítio do PEG ao terminal N ou C dos ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo ou por intermédio de grupos épsilon-amino presentes nos resíduos de lisina. A derivação de polímero linear ou ramificada que resulta em perda
5 mínima de atividade biológica será usada. O grau de conjugação será intimamente monitorado pela SDS-PAGE e espectrometria de massa para garantir a conjugação apropriada de moléculas de PEG aos anticorpos. O PEG não reagido pode ser separado dos conjugados de anticorpo-PEG, por exemplo, pela exclusão de tamanho ou cromatografia de troca iônica.

10 É entendido que os anticorpos humanizados planejados pelo presente método podem ter substituições de aminoácido conservativas adicionais que substancialmente não têm nenhum efeito sobre a ligação de antígeno ou outras funções de imunoglobulina. Por substituições conservativas é intencionada combinações tais como gly, ala; val, ile, leu; asp,
15 glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; e phe, tyr.

Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. No geral, as imunoglobulinas humanizadas, incluindo anticorpos humanizados, foram construídos por meio da engenharia genética. As imunoglobulinas mais humanizadas que foram previamente descritas
20 (Jones *et al.*, *op. cit.*; Verhoeven *et al.*, *op. cit.*; Riechmann *et al.*, *op. cit.*) compreenderam uma estrutura que é idêntica à estrutura de uma cadeia da imunoglobulina humana particular, a aceitadora e as três CDR's de uma cadeia de imunoglobulina não humana doadora. Especificamente, os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de espécie não humana
25 que se ligam ao antígeno desejado tendo uma ou mais regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) da espécie não humana e regiões de estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana.

A presente invenção inclui critérios pelos quais um número limitado de aminoácidos na estrutura de uma cadeia de imunoglobulina

humanizada é escolhido como sendo o mesmo como os aminoácidos naquelas posições no doador ao invés de no aceitador, de modo a aumentar a afinidade de um anticorpo que compreende a cadeia de imunoglobulina humanizada.

5 Os anticorpos da presente invenção são gerados com base em parte no modelo que duas causas contribuintes da perda de afinidade em meios anteriores de produzir anticorpos humanizados (usando como exemplo anticorpos de camundongo como a fonte de CDR's) são:

(1) Quando as CDR's de camundongo são combinadas com a estrutura humana, os aminoácidos na estrutura próxima às CDR's se tornam
10 humanas ao invés de camundongo. Sem intencionar estar ligado pela teoria, estes aminoácidos trocados podem distorcer levemente as CDR's, porque eles criam forças eletrostáticas ou hidrofóbicas diferentes daquelas no anticorpo de camundongo doador e as CDR's distorcidas podem não fazer contatos tão eficazes com o antígeno como as CDR's o fazem no anticorpo doador; e

15 (2) Aminoácidos no anticorpo de camundongo original que estão próximos, mas não parte das CDR's (isto é, ainda parte da estrutura), podem fazer contatos com o antígeno que contribuem para a afinidade. Estes aminoácidos são perdidos quando o anticorpo é humanizado, porque todos os aminoácidos da estrutura são feitos humanos.

20 Para evitar estes problemas e para produzir anticorpos humanizados que tenham uma afinidade muito forte para um antígeno desejado, a presente invenção usa um ou mais dos seguintes princípios para designar imunoglobulinas humanizadas. Também, os critérios podem ser usados isoladamente ou quando necessário em combinação, para obter a
25 afinidade desejada ou outras características.

Um princípio é que como aceitador, uma estrutura é usada a partir de uma imunoglobulina humana particular que não é usualmente homóloga à imunoglobulina doadora a ser humanizado ou usar uma estrutura de consenso de muitos anticorpos humanos. Por exemplo, a comparação da

seqüência de uma região variável de cadeia pesada (ou leve) de camundongo contra regiões variáveis pesadas (ou leves) humanas em um banco de dados (por exemplo, o National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource) mostra que o grau de homologia para regiões humanas diferentes varia enormemente, tipicamente de cerca de 40% a cerca de 60 a 70%. Escolhendo-se como a imunoglobulina aceitadora uma das regiões variáveis de cadeia pesada humana (respectivamente leve) que é a mais homóloga para a região variável de cadeia pesada (respectivamente leve) da imunoglobulina doadora, menos aminoácidos serão mudados indo da imunoglobulina doadora para a imunoglobulina humanizado. Por este motivo e mais uma vez sem intencionar estar ligado pela teoria, acredita-se que exista uma chance menor de mudar um aminoácido próximo das CDR's que distorcem a sua conformação. Além disso, a forma global precisa de um anticorpo humanizado que compreende a cadeia de imunoglobulina humanizada pode mais intimamente ser parecida com a forma do anticorpo doador, reduzindo também a chance de distorcer as CDR's.

Tipicamente, uma das 3 a 5 seqüências da região variável de cadeia pesada mais homólogas em uma coleção representativa de pelo menos cerca de 10 a 20 cadeias pesadas humanas distintas serão escolhidas como aceitadoras para fornecer a estrutura de cadeia pesada e similarmente para a cadeia leve. Preferivelmente, uma das 1 a 3 regiões variáveis mais homólogas serão usadas. A cadeia de imunoglobulina aceitadora selecionada mais preferivelmente terá pelo menos cerca de 65% de homologia na região estrutural para imunoglobulina doadora.

Em muitos casos, pode ser considerado preferível usar cadeias leves e pesadas do mesmo anticorpo humano como seqüências aceitadoras, para estar certo de que as cadeias leves e pesadas humanizadas tornarão os contatos favoráveis entre si. Neste caso, o doador de cadeias leves e pesadas serão comparados apenas contra cadeias de anticorpos humanos cuja

seqüência completa seja conhecida, por exemplo, os anticorpos Eu, Lay, Pom, Wol, Sie, Gal ou e WEA (Kabat *et al.*, *op. cit.*; ocasionalmente, os últimos poucos aminoácidos de uma cadeia humana não são conhecidos e devem ser deduzidos pela homologia a outros anticorpos humanos). O anticorpo humano
5 será escolhido em que as seqüências das regiões variáveis de cadeia leve e pesada, quando juntas, são de lado a lado mais homólogos às seqüências da variável de cadeia leve e pesada doadoras. Algumas vezes maior peso será dado à seqüência de cadeia pesada. O anticorpo humano escolhido fornecerá então as seqüências aceitadora tanto de cadeia leve quanto pesada. Na prática,
10 é freqüentemente encontrado que o anticorpo Eu humano servirá para este papel.

De acordo com o chamado método “de melhor ajuste”, a seqüência do domínio variável de um anticorpo de roedor é triado contra a biblioteca inteira de seqüências de domínio variável humanas conhecidas. A
15 seqüência humana que está mais próxima daquela do roedor é depois aceita como a estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chotia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Um outro método usa uma estrutura particular derivada da seqüência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de
20 cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para diversos anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Independente de como a imunoglobulina aceitadora é escolhida, afinidade mais alta pode ser obtida pela seleção de um número
25 pequeno de aminoácidos na estrutura da cadeia de imunoglobulina humanizada para ser a mesma como os aminoácidos naquelas posições no doador ao invés de no aceitador. Freqüentemente, os resíduos estruturais nas regiões de estrutura humana serão substituídos com o resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR para alterar, preferivelmente melhorar, a ligação

de antígeno. Estas substituições de estrutura são identificadas pelos métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, pela modelagem das interações da CDR e resíduos estruturais para identificar resíduos estruturais importantes pela ligação de antígeno e comparação de seqüência para identificar resíduos estruturais não usuais nas posições particulares. (Ver, por exemplo, Queen *et al.*, Pat. U.S. Nº 5.585.089; Riechmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988), que são aqui incorporadas por referência nas suas totalidades). Os anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas no ramo incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (EP 239.400; publicação PCT WO 91/09967; Pat. U.S. Nºs 5.225.539; 5.530.101; e 5.585.089), embutimento ou revestimento (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska. *et al.*, PNAS 91: 969-973 (1994)) e embaralhamento de cadeia (Pat. U.S. Nº 5.565.332). Conseqüentemente, tais anticorpos “humanizado” são anticorpos quiméricos (Pat. U.S. Nº 4.816.567) em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana.

Um segundo princípio é que as seguintes categorias definem quais aminoácidos podem ser selecionados do doador. Preferivelmente, em muitas ou todas as posições de aminoácido em uma destas categorias, o aminoácido doador de fato será selecionado.

Categoria 1: A posição de aminoácido está em uma CDR é definido por Kabat *et al.*, *op. cit.*

Categoria 2: Se um aminoácido na estrutura da imunoglobulina aceitadora humana não é usual (isto é, “raro”, que como aqui usado indica um aminoácido que ocorre naquela posição em menos do que cerca de 20% mas usualmente menos do que cerca de 10% das seqüências da região V da cadeia pesada (respectivamente leve) humanas em um banco de dados representativo) e se o aminoácido doador nesta posição é típico para as

seqüências humanas (isto é, “comum”, que como aqui usado indica um aminoácido que ocorre em mais do que cerca de 25% mas usualmente mais do que cerca de 50% das seqüências em um banco de dados representativo), então o aminoácido doador ao invés do aceitador pode ser selecionado. Este

5 critério ajuda a garantir que um aminoácido atípico na estrutura humana não rompe a estrutura do anticorpo. Além disso, pela substituição de um aminoácido não usual com um aminoácido do anticorpo doador que resulta ser típico para anticorpos humanos, o anticorpo humanizado pode ser feito menos imunogênico. Todas as seqüências da região variável de cadeia leve e

10 pesada humanas são respectivamente agrupadas em “subgrupos” das seqüências que são especialmente homólogas entre si e têm os mesmos aminoácidos em certas posições críticas (Kabat *et al.*, *op. cit.*). Quando da decisão de que um aminoácido em uma seqüência aceitadora humana é “raro” ou “comum” entre as seqüências humanas, freqüentemente será preferível

15 considerar apenas aquelas seqüências humanas no mesmo subgrupo como a seqüência aceitadora.

Categoria 3: Nas posições imediatamente adjacente a uma ou mais das 3 CDR's na seqüência primária da cadeia de imunoglobulina humanizada, o(s) aminoácido(s) doador(es) ao invés do aminoácido aceitador

20 podem ser selecionados. Estes aminoácidos são particularmente prováveis de interagir com os aminoácidos nas CDR's e, se escolhidos do aceitador, para distorcer as CDR's do doador e reduzir a afinidade. Além disso, os aminoácidos adjacentes podem interagir diretamente com o antígeno (Amit *et al.*, Science, 233, 747-753 (1986), que é aqui incorporada por referência) e

25 selecionar estes aminoácidos do doador pode ser desejável para manter todos os contatos de antígeno que fornecem afinidade no anticorpo original.

Categoria 4: Um modelo 3-dimensional, tipicamente do anticorpo doador original, mostra que certos aminoácidos fora das CDR's estão próximos às CDR's e têm uma boa probabilidade de interagir com os

aminoácidos nas CDR's pela ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, etc. Nestas posições de aminoácido, o aminoácido da imunoglobulina doadora ao invés do aminoácido da imunoglobulina aceitadora pode ser selecionado. Os aminoácidos de acordo com este critério

5 no geral terão um átomo de cadeia lateral dentro de cerca de 3 unidades ângstrom de algum átomo nas CDR's e devem conter um átomo que possa interagir com os átomos da CDR de acordo com forças químicas estabelecidas, tais como aquelas listadas acima.

No caso de átomos que podem formar uma ligação de

10 hidrogênio, os 3 ângstroms são medidos entre seus núcleos, mas para os átomos que não formam uma ligação, os 3 ângstroms são medidos entre as suas superfícies de Van der Waals. Conseqüentemente, no último caso, os núcleos devem estar dentro de cerca de 6 ângstroms (3 + a soma dos raios de Van der Waals) para que os átomos sejam considerados capazes de interagir.

15 Em muitos casos os núcleos serão separados em 4 ou 5 a 6.ÂNG. Na determinação se um aminoácido pode interagir com as CDRs, é preferido não considerar os últimos 8 aminoácidos da CDR 2 de cadeia pesada como parte das CDRs, porque do ponto de vista de estrutura, estes 8 aminoácidos comportam-se mais como parte da estrutura.

20 Os aminoácidos na estrutura que são capazes de interagir com os aminoácidos nas CDR's e que portanto pertencem à Categoria 4, podem ser distinguidos de um outro modo. A área de superfície acessível ao solvente de cada aminoácido da estrutura é calculada de duas maneiras: (1) no anticorpo intacto e (2) em uma molécula hipotética que consiste do anticorpo

25 com as suas CDRs removidas. Uma diferença significativa entre estes números de cerca de 10 ângstroms quadrados ou mais mostra que o acesso ao aminoácido da estrutura pelo solvente é pelo menos parcialmente bloqueado pelas CDRs e portanto que o aminoácido está fazendo contato com as CDRs. A área de superfície acessível ao solvente de um aminoácido pode ser

calculada com base em um modelo 3-dimensional de um anticorpo, usando algoritmos conhecidos na técnica (por exemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16, 548 (1983) e Lee e Richards, J. Mol. Biol. 55, 379 (1971), ambas as quais são aqui incorporadas por referência). Os aminoácidos da estrutura também
 5 podem ocasionalmente interagir com as CDR's indiretamente, pela influência da conformação de um outro aminoácido da estrutura que por sua vez contata as CDR's.

Os aminoácidos em diversas posições na estrutura são conhecidos serem capazes de interagir com as CDRs em muitos anticorpos
 10 (Chotia e Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chotia *et al.*, Nature 342, 877 (1989) e Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990), todas as quais são aqui incorporadas por referência), notavelmente nas posições 2, 48, 64 e 71 da cadeia leve e 26 a 30, 71 e 94 da cadeia pesada (numeração de acordo com Kabat, *op. cit.*) e portanto estes aminoácidos no geral estarão na Categoria 4.
 15 Tipicamente, as imunoglobulinas humanizadas, da presente invenção incluirão aminoácidos doadores (onde diferente) na Categoria 4 além destes. Os aminoácidos nas posições 35 na cadeia leve e 93 e 103 na cadeia pesada também são prováveis de interagir com as CDRs. Em todas estas posições numeradas, a escolha do aminoácido doador ao invés do aminoácido aceitador
 20 (quando eles diferirem) para estar na imunoglobulina humanizada é preferido. Por outro lado, certas posições que podem estar na Categoria 4 tal como os primeiros 5 aminoácidos da cadeia leve algumas vezes podem ser escolhidas da imunoglobulina aceitadora sem perda de afinidade na imunoglobulina humanizada. Chotia e Lesk (*op. cit.*) definem as CDRs de modo diferente de
 25 Kabat *et al.* (*op. cit.*). Notavelmente, a CDR1 é definida como incluindo os resíduos de 26 a 32. Conseqüentemente, Riechmann *et al.*, (*op. cit.*) escolhem estes aminoácidos das imunoglobulinas doadoras.

Também é importante que os anticorpos sejam humanizados com a retenção de alta afinidade quanto ao antígeno e outras propriedades

biológicas favoráveis. Para se alcançar esta meta, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das seqüências precursoras e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tri-dimensionais das seqüências precursoras e humanizadas.

- 5 Programas de computador são disponíveis que ilustram e demonstram as estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de seqüências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas demonstrações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da seqüência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que
- 10 influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata para ligar seu antígeno. Deste modo, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das seqüências receptoras e importadoras de modo que as características de anticorpo desejadas, tais como afinidade aumentada para o(s) antígeno(s) alvo, sejam obtidas. No geral, os resíduos de CDR estão direta e
- 15 mais substancialmente envolvidos na influência da ligação de antígeno. Programas de computador para criar modelos de proteínas tais como anticorpos são no geral disponíveis e bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica (ver, Levy *et al.*, Biochemistry, 28, 7168-7175 (1989); Bruccoleri *et al.*, Nature, 335, 564-568 (1988); Chotia *et al.*, Science, 233, 755-758
- 20 (1986), todas as quais são aqui incorporadas por referência). Estes não formam parte da invenção. De fato, porque todos os anticorpos têm estruturas similares, as estruturas de anticorpo conhecidas, que são disponíveis da Brookhaven Protein Data Bank, podem ser usados se necessário como modelos brutos de outros anticorpos. Os programas de computador
- 25 comercialmente disponíveis podem ser usados para demonstrar estes modelos em um monitor de computador, para calcular a distância entre os átomos e para estimar a probabilidade de aminoácidos diferentes interagirem (ver, Ferrin *et al.*, J. Mol. Graphics, 6, 13-27 (1988)).

Além das categorias acima, que descrevem quando um

aminoácido na imunoglobulina humanizada pode ser tirado do doador, certos aminoácidos na imunoglobulina humanizada podem ser tirados nem do doador nem do aceitador, se depois caem na:

5 Categoria 5: Se o aminoácido em uma dada posição na
imunoglobulina doadora é “raro” para as seqüências humanas e o aminoácido
nesta posição na imunoglobulina aceitadora também é “raro” para as
seqüências humanas, como definido acima, então o aminoácido nesta posição
na imunoglobulina humanizado pode ser escolhido ser algum aminoácido
“típico” das seqüências humanas. Uma escolha preferida é o aminoácido que
10 ocorre mais freqüentemente naquela posição nas seqüências humanas
conhecidas pertencentes ao mesmo subgrupo como a seqüência aceitadora.

Os anticorpos humanizados no geral têm pelo menos três vantagens potenciais em relação ao de camundongo ou em alguns casos anticorpos quiméricos para o uso em terapia humana:

15 (1) Porque a porção efetora é humana, a mesma pode interagir
melhor com as outras partes do sistema imune humano (por exemplo, destruir
as células alvo mais eficientemente pela citotoxicidade dependente de
complemento (CDC) ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo
(ADCC)).

20 (2) O sistema imune humano não deve reconhecer a estrutura
ou região constante do anticorpo humanizado como estranhos e portanto a
resposta de anticorpo contra um tal anticorpo injetado deve ser menor do que
contra um anticorpo de camundongo totalmente estranho ou um anticorpo
quimérico parcialmente estranho.

25 (3) Os anticorpos de camundongo injetados foram relatados ter
uma meia-vida na circulação humana muito mais curta do que a meia-vida de
anticorpos normais (D. Shaw *et al.*, J. Immunol., 138, 4534-4538 (1987)). Os
anticorpos humanizados injetados presumivelmente terão uma meia-vida mais
similar a dos anticorpos humanos que ocorrem naturalmente, possibilitando

que doses menores e menos freqüentes sejam dadas.

Em um aspecto, a presente invenção está direcionada ao planejamento de anticorpos humanizados que são produzidos pelos segmentos de DNA que expressam segmentos de DNA recombinantes que codificam as CDR's de cadeia pesada e leve de uma imunoglobulina doadora capaz de ligação a um antígeno desejado, tal como IL-31, ligado aos segmentos de DNA que codificam as regiões de estrutura aceitadora humanas.

Os segmentos de DNA tipicamente incluirão ainda uma seqüência de DNA de controle de expressão operavelmente ligada às seqüências que codificam a imunoglobulina humanizada, incluindo as regiões promotoras naturalmente associadas ou heterólogas. As seqüências de controle de expressão serão sistemas promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, mas as seqüências de controle para hospedeiros procarióticos também podem ser usadas. Uma vez que o vetor tenha sido incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para a expressão em alto nível das seqüências de nucleotídeo, e, como desejado, a coleta e purificação das cadeias leves, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ou outras formas de imunoglobulina humanizados pode seguir (ver, S. Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979), que é aqui incorporada por referência).

As seqüências de DNA da região constante humanas podem ser isoladas de acordo com procedimentos bem conhecidos a partir de uma variedade de células humanas, mas preferivelmente células B imortalizadas (ver, Kabat *op. cit.* e WP87/02671). As CDR's para produzir as imunoglobulinas da presente invenção serão similarmente derivadas de anticorpos monoclonais capazes de ligação ao antígeno pré determinado, tal como IL-31 e produzidas por métodos bem conhecidos em qualquer fonte de

mamífero conveniente incluindo, camundongos, ratos, coelhos ou outros vertebrados, capazes de produzir anticorpos. As células fontes adequadas para as seqüências de DNA da região constante e estrutura e as células hospedeiras para a expressão e secreção da imunoglobulina, podem ser obtidas de várias fontes, tais como da American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," sexta edição (1988) Rockville, Md. U.S.A., que é aqui incorporada por referência).

Além das imunoglobulinas humanizadas especificamente aqui descritas, outras imunoglobulinas "substancialmente homólogas" modificadas em relação às seqüências nativas podem ser facilmente planejadas e fabricadas utilizando várias técnicas de DNA recombinante bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Uma variedade de regiões de estrutura humana diferentes pode ser usada isoladamente ou em combinação como uma base para as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção. No geral, as modificações dos genes podem ser facilmente realizadas por uma variedade de técnicas bem conhecidas, tais como a mutagênese direcionada ao sítio (ver, Gillman e Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979) e S. Roberts *et al.*, *Nature*, 328, 731-734 (1987), ambas as quais são aqui incorporadas por referência).

Os anticorpos humanizados da invenção incluem fragmentos assim como anticorpos intactos. Tipicamente, estes fragmentos competem com o anticorpo intacto a partir do qual eles foram derivados pela ligação de antígeno. Os fragmentos tipicamente se ligam com uma afinidade de pelo menos 10^7 M^{-1} e mais tipicamente 10^8 ou 10^9 M^{-1} (isto é, dentro das mesmas faixas como o anticorpo intacto). Os fragmentos de anticorpo humanizados incluem cadeias pesadas, cadeias leves, Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv separados. Os fragmentos são produzidos pelas técnicas de DNA recombinante ou pela separação enzimática ou química de imunoglobulinas intactas.

Para mais detalhes sobre a humanização de anticorpos, ver as Patentes Européias N^{os} EP 239.400, EP 592.106 e EP 519.596; Publicação

Internacional N^{os} WO 91/09967 e WO 93/17105; Pat. U.S. N^{os} 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886 e 6.407.213; e Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91: 969-973; Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-1125; Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13: 353-360; Maisa *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-279; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684; Roguska *et al.*, 1996, *Proteína Eng.* 9: 895-904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (Supl 23): 5973s-5977s; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-1722; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-410; Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-973; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-329; e Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por intermédio da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) e Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem ser agora produzidos diretamente pelas células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados das bibliotecas de fago de anticorpo debatidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados da *E. coli* e quimicamente ligado para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com um outro método, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo estarão evidentes ao técnico habilitado. Além disso, exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir Fvs de cadeia única e anticorpos incluem aqueles descritos nas Pat. U.S. 4.946.778 e 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); e Skerra *et al.*, *Science* 240: 1038-1040 (1988).

A presente invenção abrange anticorpos recombinantemente fundidos ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações tanto covalentes quanto não covalentes) a um polipeptídeo (ou porção deste, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção para gerar proteínas de fusão. Assim, a invenção também diz respeito a imunoconjugados que compreendem o anticorpo aqui descrito conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou fragmentos destes) ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

A presente invenção abrange anticorpos recombinantemente fundidos ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações tanto covalentes quanto não covalentes) a um polipeptídeo (ou porção deste, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção para gerar proteínas de fusão. A fusão não precisa ser necessariamente direta, mas pode ocorrer através de seqüências ligadoras. Os anticorpos podem ser específicos para antígenos outros que não os polipeptídeos (ou porção destes, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção. Por exemplo, os anticorpos podem ser usados para alvejar os polipeptídeos da presente invenção a tipos de célula particulares, *in vitro* ou *in vivo*, fundindo-se ou conjugando-se os polipeptídeos da presente invenção aos anticorpos específicos para receptores de superfície celular particulares. Os anticorpos fundidos ou conjugados aos polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em imunoensaios *in vitro* e os métodos de purificação usando métodos conhecidos na técnica. Ver por exemplo, Harbor *et al.*, supra e publicação PCT WO 93/21232; EP 439,095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39: 91-99 (1994); Pat. U.S. Nº 5.474.981; Gillies *et al.*, PNAS 89: 1428-1432 (1992); Fell *et al.*, J. Immunol. 146: 2446-2452 (1991), que são

incorporadas por referência em suas totalidades.

A presente invenção inclui ainda composições que compreendem os polipeptídeos da presente invenção (por exemplo, aqueles que compreendem um epítipo imunogênico ou antigênico) fundido ou conjugado às seqüências de polipeptídeo heterólogas (por exemplo, domínios de anticorpo outros que não as regiões variáveis). Por exemplo, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fundidos ou conjugados a uma região de anticorpo Fc ou porção desta. Por exemplo, os polipeptídeos da presente invenção (incluindo fragmentos ou variantes destes), podem ser fundidos com os domínios constantes de imunoglobulina (IgA, IgE, IgG, IgM) ou porções destes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} ou qualquer combinação destes e porções destes, resultando em polipeptídeos quiméricos. A porção de anticorpo fundida a um polipeptídeo da presente invenção pode compreender a região constante, a região de fechadura, o domínio C_{H1} , o domínio C_{H2} e o domínio C_{H3} ou qualquer combinação de domínios inteiros ou porções destes. Os polipeptídeos também podem ser fundidos ou conjugados às porções de anticorpo acima para formar multímeros. Por exemplo, porções Fc fundidas aos polipeptídeos da presente invenção podem formar dímeros através da ligação de dissulfeto entre as porções Fc. As formas multiméricas superiores podem ser fabricadas fundindo-se os polipeptídeos às porções de IgA e IgM. Os métodos para fundir ou conjugar os polipeptídeos da presente invenção às porções de anticorpo são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, as Pat. U.S. N^{os} 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.112.946, EP 307.434, EP 367.166, publicações PCT WO 96/04388, WO 91/06570, Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991), Zheng *et al.*, J. Immunol. 154: 5590-5600 (1995), e Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341 (1992) (as ditas referências incorporadas por referência em suas totalidades). Por via de um outro exemplo não limitante, os polipeptídeos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos ou

variantes destes) podem ser fundidos com albumina (incluindo mas não limitada à albumina sérica humana recombinante ou fragmentos ou variantes desta (ver, por exemplo, a Pat. U.S. Nº 5.876.969, concedida em 2 de março de 1999, Patente EP 0 413 622 e Pat. U.S. Nº 5.766.883, concedida em 16 de junho de 1998, aqui incorporada por referência em sua totalidade)). Os polipeptídeos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos ou variantes destes) podem ser fundidos à extremidade dos terminais N ou C da proteína heteróloga (por exemplo, polipeptídeo de imunoglobulina Fc ou polipeptídeo da albumina sérica humana). Os polinucleotídeos que codificam proteínas de fusão da invenção também são abrangidos pela invenção.

Como debatido acima, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fundidos ou conjugados às porções de anticorpo acima para aumentar a meia vida *in vivo* dos polipeptídeos ou para o uso em imunoensaios usando métodos conhecidos na técnica. Além disso, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fundidos ou conjugados às porções de anticorpo acima para facilitar a purificação. Um exemplo relatado descreve proteínas quiméricas que consistem dos primeiros dois domínios do polipeptídeo CD4 humano e vários domínios das regiões constantes das cadeias pesadas ou leves de imunoglobulinas de mamífero. (Ver, por exemplo, a EP 394.827; Traunecker *et al.*, Nature 331: 84-86 (1988)). A liberação realçada de um antígeno através da barreira epitelial ao sistema imune foi demonstrada para os antígenos (por exemplo, insulina) conjugados a um parceiro de ligação FcRn tal como IgG ou fragmentos Fc (ver, por exemplo, as Publicações PCT WO 96/22024 e WO 99/04813). Os polipeptídeos da presente invenção fundidos ou conjugados a um anticorpo tendo estruturas diméricas ligadas a dissulfeto (devido à IgG) também podem ser mais eficientes em ligação e neutralização de outras moléculas, do que a proteína secretada monomérica ou fragmento de proteína sozinhos. (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995)). Em muitos casos, a

parte Fc em uma proteína de fusão é benéfica em terapia e diagnóstico e assim pode resultar, por exemplo, em propriedades farmacocinéticas melhoradas. (EP A 232.262). Alternativamente, deletar a parte Fc depois que a proteína de fusão foi expressada, detectada e purificada, seria desejado. Por exemplo, a

5 porção Fc pode impedir a terapia e diagnóstico se a proteína de fusão é usada como um antígeno para imunizações. Na descoberta de medicamentos, por exemplo, de proteínas humanas, tais como hIL-5, foram fundido com porções Fc para o propósito de ensaios de triagem de alto rendimento para identificar antagonistas de hIL-5. (Ver, D. Bennett *et al.*, J. Molecular Recognition 8: 52-

10 58 (1995); K. Johanson *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995)0. Tais técnicas também incluem, mas não são limitados ao uso de agentes de conjugação bifuncionais (ver por exemplo, as Pat. U.S. N^{os} 5.756.065, 5.714.631, 5.696.239, 5.652.361, 5.505.931, 5.489.425, 5.435.990, 5.428.139, 5.342.604, 5.274.119, 4.994.560 e 5.808.003, os conteúdos de cada uma das

15 quais são por meio deste incorporados por referência em sua totalidade).

Além disso, os polipeptídeos da invenção (por exemplo, anticorpos ou fragmentos destes) podem ser fundidos a seqüências marcadoras, tais como um peptídeo para facilitar a sua purificação. Em uma outra forma de realização, ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da

20 invenção (incluindo, mas não limitados aos ácidos nucleicos que codificam epítomos imunogênicos e/ou antigênicos) também podem ser recombinados com um gene de interesse como um rótulo de epítopo (por exemplo, o rótulo de hemaglutinina ("HA") ou rótulo indicador) para ajudar na detecção e purificação do polipeptídeo expressado. Em formas de realização preferidas, a

25 seqüência de aminoácido marcadora é um peptídeo de hexa-histidina, tal como o rótulo fornecido em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre outros, muitos dos quais são comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), por exemplo, a hexa-histidina fornece

purificação da proteína de fusão conveniente. Outros rótulos de peptídeo úteis para a purificação incluem, mas não são limitados ao rótulo “HA”, que corresponde a um epítopo derivado da proteína de hemaglutinina da influenza (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)) e o rótulo “indicador”.

5 A presente invenção abrange ainda anticorpos ou fragmentos destes conjugados a um agente de diagnóstico ou terapêutico. Os anticorpos podem ser usados em diagnóstico, por exemplo, para monitorar o desenvolvimento ou progressão de um tumor como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para determinar a eficácia de um dado regime
10 de tratamento, diagnóstico, detecção e/ou prevenção. A detecção pode ser facilitada pela ligação do anticorpo a uma substância detectável. Os exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais que emitem pósitron usando várias tomografias
15 de emissão de pósitron e íons metálicos paramagnéticos não radioativos. Ver, por exemplo, a Pat. U.S. Nº 4.741.900 quanto a íons metálicos que podem ser conjugados aos anticorpos para o uso como diagnósticos de acordo com a presente invenção. Os exemplos de enzimas adequadas incluem rábano peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase; os
20 exemplos de complexos de grupo protético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinil-amina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; os
25 exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In ou ^{99}Tc .

Além disso, um anticorpo ou fragmento deste podem ser conjugados a uma porção terapêutica tal como uma citotoxina, por exemplo,

um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um íon de metal radioativo. Uma citotoxina ou agente citotóxico incluem qualquer agente que seja nocivo para as células. Os exemplos incluem paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, 5 tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos destes. Os agentes terapêuticos incluem, mas não são limitados a, antimetabólitos (por 10 exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, 15 daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

Os conjugados da invenção podem ser usados para modificar 20 uma dada resposta biológica, o agente terapêutico ou porção medicamentosa não devem ser interpretados como limitados aos agentes terapêuticos da química clássica. Por exemplo, a porção medicamentosa pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possua uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina, 25 exotoxina de pseudomonas ou toxina da difteria; uma proteína tal como o fator de necrose de tumor, α -interferon, beta-interferon, fator de crescimento de nervo, fator de crescimento derivado de plaqueta, ativador de plasminogênio de tecido, um agente trombótico ou um agente anti-angiogênico, por exemplo, angiostatina ou endostatina; ou, modificadores da

resposta biológica tal como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 (“IL-1”), interleucina-2 (“IL-2”), interleucina-6 (“IL-6”), fator estimulador de colônia de macrófase granulocítica (“GM-CSF”), fator estimulador de colônia granulocítica (“G-CSF”) ou outros fatores de crescimento.

5 Os anticorpos também podem ser ligados aos suportes sólidos, que são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do antígeno alvo. Tais suportes sólidos incluem, mas não são limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila ou polipropileno.

As técnicas para conjugar tal porção terapêutica aos anticorpos
 10 são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, em *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243- 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, em *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel
 15 Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, em *Monoclonal Antibodies ‘84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled
 20 Antibody In Cancer Therapy”, em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982).

Alternativamente, um anticorpo pode ser conjugado a um segundo anticorpo para formar um anticorpo heteroconjugado como descrito
 25 por Segal em Pat. U.S. Nº 4.676.980, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Um anticorpo, com ou sem uma porção terapêutica conjugada a ele, administrado sozinho ou em combinação com fator(es) citotóxico(s) e/ou citocina(s) pode ser usado como um produto terapêutico.

Em uma outra forma de realização, o anticorpo pode ser conjugado a um “receptor” (tal como estreptavidina) para utilização no pré alvejamento de tumor em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção do conjugado não ligado da circulação usando um agente de depuração e depois a administração de um “ligando” (por exemplo avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (por exemplo um radionuclídeo).

Uma variedade de ensaios conhecidos por aqueles habilitados na técnica pode ser utilizada para detectar anticorpos que se ligam às proteínas ou polipeptídeos de IL-31. Os ensaios exemplares são descritos em detalhes em Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow e Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Os exemplos representativos de tais ensaios incluem: a imunoeletroforese concorrente, radioimunoensaio, radioimuno-precipitação, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), ensaio de *dot blot* ou Western blot, ensaio de inibição ou competição e ensaio de intercalação. Além disso, os anticorpos podem ser triados quanto a ligação à proteína ou polipeptídeo de IL-31 do tipo selvagem versus mutante.

Os anticorpos para IL-31 podem ser usados para alvejar células que expressam IL-31; para isolar IL-31 pela purificação de afinidade; para os ensaios de diagnóstico para determinar os níveis circulantes de polipeptídeos de IL-31; para detectar ou quantificar IL-31 solúvel como um marcador de patologia ou doença subjacente; em métodos analíticos utilizando FACS; para triar bibliotecas de expressão; para gerar anticorpos anti-idiotípicos; e como anticorpos neutralizadores ou como antagonistas para bloquear a atividade de IL-31 *in vitro* e *in vivo*. Os rótulos ou etiquetas diretos adequados incluem radionuclídeos, enzimas, substratos, cofatores, inibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminescentes, partículas magnéticas e outros; os rótulos ou etiquetas indiretos podem caracterizar o uso de biotina-avidina ou outros pares de complemento/anti-complemento

como intermediários. Os anticorpos aqui também podem ser direta ou indiretamente conjugados aos medicamentos, toxinas, radionuclídeos e outros e estes conjugados usados para aplicações de diagnóstico ou terapêuticas *in vivo*. Além disso, os anticorpos para IL-31 ou fragmentos destes podem ser
5 usados *in vitro* para detectar IL-31 desnaturado ou fragmentos destes em ensaios, por exemplo, Western Blots ou outros ensaios conhecidos na técnica.

As moléculas detectáveis adequadas podem ser direta ou indiretamente ligadas ao polipeptídeo ou anticorpo e incluem radionuclídeos, enzimas, substratos, cofatores, inibidores, marcadores fluorescentes,
10 marcadores quimioluminescentes, partículas magnéticas e outros. As moléculas citotóxicas adequadas podem ser direta ou indiretamente ligadas ao polipeptídeo ou anticorpo e incluem toxinas bacterianas ou vegetais (por exemplo, difteria, toxina, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina e outros), assim como radionuclídeos terapêuticos, tais como iodo-131, rênio-
15 188 ou ítrio-90 (diretamente ligados ao polipeptídeo ou anticorpo ou indiretamente ligados através de meios de uma porção queladora, por exemplo). Os polipeptídeos ou anticorpos também podem ser conjugados aos medicamentos citotóxicos, tais como adriamicina. Para a ligação indireta de uma molécula detectável ou citotóxica, a molécula detectável ou citotóxica
20 pode ser conjugada com um membro de um par complementar/anticomplementar, onde o outro membro é ligado à porção de polipeptídeo ou anticorpo. Para estes propósitos, biotina/estreptavidina é um par complementar/anticomplementar exemplar.

Os polipeptídeos de ligação também podem atuar como
25 “antagonistas” de IL-31 para bloquear a ligação de IL-31 e a transdução de sinal *in vitro* e *in vivo*. Estes polipeptídeos de ligação anti-IL-31 seriam úteis para inibir a atividade de IL-31 ou ligação da proteína.

As proteínas de fusão de toxina de polipeptídeo ou as proteínas de fusão anticorpo-toxina podem ser usadas para a inibição ou ablação de

célula ou tecido alvejadas (por exemplo, para tratar células ou tecidos cancerosos). Alternativamente, se o polipeptídeo tem domínios funcionais múltiplos (isto é, um domínio de ativação ou um domínio de ligação de receptor, mais um domínio alvejador), uma proteína de fusão incluindo apenas o domínio alvejador pode ser adequada para direcionar uma molécula detectável, uma molécula citotóxica ou uma molécula complementar a um tipo de célula ou tecido de interesse. Em casos onde o domínio exceto a proteína de fusão inclui uma molécula complementar, a molécula anti-complementar pode ser conjugada a uma molécula detectável ou citotóxica. Tais proteínas de fusão da molécula complementar de domínio representam assim um carregador ou veículo alvejador genérico para a liberação específica de célula/tecido de conjugados de anti-complementar-detectável/molécula citotóxica genéricos.

Em uma outra forma de realização, as proteínas de fusão de anticorpo IL-31-citocina podem ser usadas para matança *in vivo* de tecidos alvo (por exemplo, leucemia, linfoma, câncer pulmonar, câncer de cólon, melanoma, câncer pancreático, câncer ovariano, cânceres de pele, sangue e medula óssea ou outros cânceres em que os receptores de IL-31 são expressados) (Ver, no geral, Hornick *et al.*, Blood 89: 4437-47, 1997). As proteínas de fusão descritas permitem o alvejamento do anticorpo a um sítio desejado de ação, fornecendo deste modo uma concentração local elevada de anticorpo. Os polipeptídeos de IL-31 ou os anticorpos anti-IL-31 adequados alvejam uma célula ou tecido indesejáveis (isto é, um tumor ou uma leucemia) e a citocina fundida mediou a lise da célula alvo melhorada pelas células efectoras. As citocinas adequadas para este propósito incluem interleucina 2 e fator estimulador de colônia de macrófago granulocítico (GM-CSF), por exemplo.

Já em uma outra forma de realização, se o polipeptídeo de IL-31 ou anticorpo anti-IL-31 alvejam células ou tecidos vasculares, tais

polipeptídeo ou anticorpo podem ser conjugados com um radionuclídeo e particularmente com um radionuclídeo beta-emissor, para reduzir a restenose.

Os anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser medidos quanto a sua capacidade para inibir, bloquear ou neutralizar o
5 ligando de IL-31 como determinado pelos vários modelos *in vivo* conhecidos na técnica e aqui descritos, incluindo mas não limitados ao modelo NC/Nga, o modelo epicutâneo Ova, o modelo da hipersensibilidade crônica e o modelo de hapteno crônico.

Tanto as células T residentes na pele quanto os queratinócitos
10 epidérmicos foram implicados na patologia de doenças da pele em seres humanos. O mRNA de IL-31 e a expressão de proteína são restritos à população de célula T CLA⁺ residentes na pele em seres humanos. Como tal, um antagonista para IL-31, incluindo um anticorpo ou antagonista de receptor serão úteis no tratamento de doenças da pele e epidérmicas que têm a
15 expressão de células T CLA⁺. Tais doenças incluem, por exemplo, dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por medicamento, vírus trópico de pele e prurido associado com vírus, vitiligo, linfoma de célula T cutâneo, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular e pênfigo bolhoso. Os marcadores de quimiocina tais como TARC e MDC são
20 úteis para medir o efeito de um anticorpo monoclonal neutralizador para IL-31. Como mostrado no Exemplo 15, os efeitos inibidores de tratamento com anticorpos anti-IL-31 aqui descritos podem ser medidos pelo monitoramento dos níveis de TARC e MDC.

Dermatite de contato

25 A dermatite de contato alérgica é definida como uma reação imune mediada pela T célula a um antígeno que entra em contato com a pele. A população de célula T CLA⁺ é considerada estar envolvida no início da dermatite visto que as respostas de célula T dependentes de alérgeno são amplamente confinadas à população CLA⁺ de células (Ver Santamaria-Babi,

L. F., *et al.*, J Exp Med: 181, 1935, (1995)). Dados recentes descobriram que apenas as células T (CD45RO+) CD4+ CLA+ da memória e não as CD8+ proliferam e produzem ambos os tipos de citocina tipo-1 (IFN-) e tipo-2 (IL-5) em resposta ao níquel, um alérgeno de hipersensibilidade de contato comum. Além disso, as células que expressam CLA em combinação com CD4, CD45RO (memória) ou CD69 são aumentadas depois da estimulação específica de níquel e expressam os receptores de quimiocina CXCR3, CCR4, CCR10 mas não CCR6. Ver Moed H., *et al.*, Br J Dermatol: 51, 32, (2004).

Em modelos de animal, foi demonstrado que a dermatite de contato alérgica é dependente de célula T e que as células T alérgico-responsivas migram para o sítio de aplicação de alérgeno. Ver no geral: Engeman T. M., *et al.*, J Immunol: 164, 5207, (2000); Ferguson T. A. & Kupper T. S. J Immunol: 150, 1172, (1993); e Gorbachev A. V. & Fairchild R. L. Crit Rev Immunol: 21, 451(2001). Visto que as células T CLA+ produzem IL-31 e a estimulação pela IL-31 de queratinócitos dérmicos pode induzir quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TARC e MDC, a IL-31 pode estar envolvida na fisiopatologia da dermatite de contato. Usando-se um anticorpo IL-31 neutralizante em um modelo de camundongo de hipersensibilidade de contato. Ver o Exemplo 8.

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico da Hipersensibilidade de Contato pela inibição, redução, neutralização, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Dermatite atópica

A dermatite atópica (AD) é uma doença de pele inflamatória cronicamente reincidente com uma incidência dramaticamente crescente nas últimas décadas. Clinicamente a AD é caracterizada pelas placas freqüentemente escoriadas altamente prurítica e pápulas que mostram um curso reincidente crônico. O diagnóstico de AD é principalmente

fundamentado nas descobertas clínicas maiores e menores. Ver Hanifin J. M., Arch Dermatol: 135, 1551 (1999). A histopatologia revela espongiose, paraqueratose hiper e focal em lesões agudas, ao passo que a hiperplasia epidérmica acentuada com hiper e paraqueratose, acantose/hipergranulose e
 5 infiltração perivascular da derme com linfócitos e mastóides abundantes são as marcas distintivas de lesões crônicas.

As células T desempenham um papel central no início de respostas imunes locais em tecidos e evidência sugere que as células T que infiltram a pele em particular, podem desempenhar um papel chave no início
 10 e manutenção de respostas imunes desreguladas na pele. Aproximadamente 90% das células T infiltrantes em sítios inflamatórios cutâneos expressam a Ag (CLA+) associada a linfócito cutâneo que se liga à E-selectina, uma molécula de adesão indutível no endotélio (revisado em Santamaria-Babi L. F., *et al.*, Eur J Dermatol: 14, 13, (2004)). Um aumento significativo nas
 15 células T CLA+ circulantes entre pacientes AD comparado com indivíduos de controle foi documentado (Ver Teraki Y., *et al.*, Br J Dermatol: 143, 373 (2000), enquanto que outros têm demonstrado que as células T CLA+ da memória de pacientes AD preferencialmente respondem ao extrato de alérgeno comparado com a população CLA- (Ver Santamaria-Babi, L. F., *et al.*, J Exp Med: 181, 1935, (1995)). Em seres humanos, a patogênese de
 20 distúrbios atópicos da pele foram associados com aumentos nas células T CLA+ que expressam níveis aumentados de citocinas tipo Th-2 como IL-5 e IL-13 9, 10. Ver Akdis M., *et al.*, Eur J Immunol: 30, 3533 (2000); e Hamid Q., *et al.*, J Allergy Clin Immunol: 98, 225 (1996).

25 Camundongos NC/Nga espontaneamente desenvolvem lesões como AD que se igualam com a AD humana em muitos aspectos, incluindo o curso e os sinais clínicos, histopatologia e imunopatologia quando alojados em condições isentas de patógeno não especificadas (não SPF) em torno das 6 a 8 semanas de idade. Ao contrário, camundongos NC/Nga mantidos sob

condições SPF não desenvolvem lesões de pele. Entretanto, o início de lesões de pele espontâneas e comportamento de coceira podem ser sincronizados em camundongos NC/Nga alojados em uma instalação SPF pela injeção intradérmica semanal de antígeno de ácaro de poeira bruto. Ver Matsuoka H.,
5 *et al.*, Allergy: 58, 139 (2003). Portanto, o desenvolvimento de AD em NC/Nga é um modelo útil para a avaliação de novos produtos terapêuticos para o tratamento de AD.

Além do modelo NC/Nga de AD espontânea, a sensibilização epicutânea de camundongos usando OVA também pode ser usada como um
10 modelo para induzir o espessamento epidérmico e dérmico dependente de antígeno com um infiltrado mononuclear na pele de camundongos sensibilizados. Isto coincide usualmente com níveis séricos elevados de IgE total e específico, entretanto nenhuma disfunção de barreira de pele ou prurido normalmente ocorre neste modelo. Ver Spergel J. M., *et al.*, J Clin
15 Invest, 101: 1614, (1998). Este protocolo pode ser modificado de modo a induzir a desregulação da barreira de pele e prurido pela sensibilização de camundongos transgênicos DO11.10 OVA TCR com OVA. Aumentando o número de células T específicas de antígeno que reconheceram o antígeno sensibilizante pode aumentar o nível de inflamação na pele para induzir
20 comportamento de coceira e liquenificação/escamação da pele visíveis.

Tanto o modelo de AD espontânea em NC/Nga e o modelo DO11.10 de OVA epicutânea são usados para investigar a expressão de IL-31 e IL-31RA na AD, assim como a capacidade dos anticorpos aqui descritos para inibir, reduzir ou neutralizar os efeitos de IL-31. Ver os Exemplos 9 e 10
25 aqui. Em um estudo usando o modelo NC/Nga *in vivo* (Exemplo 10), a administração de anticorpos anti-IL-31 de camundongo de rato mostrou a redução na coceira, mas não uma redução na dermatite. Os anticorpos aqui descritos são úteis para inibir a coceira associada com dermatite e doenças pruríticas incluindo a dermatite atópica, prurigo nodular e eczema. Uma

inibição, redução ou prevenção da coceira, sozinho, podem ser eficazes no tratamento de doenças pruríticas incluindo, mas não limitadas a, dermatite atópica, prurigo nodular e eczema, visto que a cessação da coceira interromperá a progressão de dermatite, o desenvolvimento da qual é dependente da coceira.

Os modelos adicionais para medir os efeitos inibitórios dos anticorpos anti-IL-31 aqui descritos são descritos por Umeuchi, H. *et al.*, *European Journal of Pharmacology*, 518: 133-139, 2005; e por Yoo, J. *et al.*, *J. Experimental Medicine*, 202: 541-549, 2005.

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico de dermatite e doenças pruríticas incluindo dermatite atópica, prurigo nodular e eczema pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Reações alérgicas cutâneas do tipo demorado induzidas por medicamento

As reações alérgicas cutâneas do tipo demorado induzidas por medicamento são muito heterogêneas e podem espelhar muitos eventos fisiopatológicos distintos. Ver Brockow K., *et al.*, *Allergy*: 57, 45 (2002). Os mecanismos imunológicos envolvidos nestas reações mostraram como mediados por anticorpo ou célula. Na alergia medicamentosa imediata uma reação de anticorpo mediada por IgE pode ser demonstrada por um teste de picada de pele e/ou intradérmica positivo depois de 20 min, ao passo que as reações não imediatas aos medicamentos podem ocorrer mais do que uma hora depois da última ingestão de medicamento e são freqüentemente mediados pela célula T. As reações do tipo demorado mediadas pela célula T não imediata podem ocorrer em pacientes com reações medicamentosas adversas às penicilinas por exemplo. As respostas de célula T proliferativa às penicilinas mostraram estar restritas à subpopulação (CD45RO+) CLA⁺ da memória de células T de pacientes alérgicos à penicilina ao passo que o

subconjunto CD45RO⁺ CLA⁻ não mostra nenhuma resposta proliferativa. Ver Blanca M., Leyva L., *et al.*, Blood Cells Mol Dis: 31, 75 (2003). As reações de hipersensibilidade do tipo demorado (DTH) podem ser artificialmente reproduzidas em camundongos, permitindo a avaliação de fatores que podem estar envolvidos na iniciação e perpetuação da resposta DTH. O anticorpo neutralizador de IL-31 pode ser eficaz nas reações de hipersensibilidade do tipo demorado. Ver Exemplo 51.

A necrólise epidérmica tóxica (TEN) é uma reação medicamentosa muito rara mas extremamente grave caracterizada pela apoptose espalhada da epiderme com bolhas extensivas. Estudos têm mostrado que os linfócitos que infiltram as bolhas são células T CLA⁺ e podem exibir citotoxicidade contra os queratinócitos epidérmicos. Ver Leyva L., *et al.*, J Allergy Clin Immunol: 105, 157 (2000); e Nassif A., Bensussan A., *et al.*, J Allergy Clin Immunol: 114, 1209 (2004). Um sistema de camundongo transgênico, por meio do qual OVA é expressado sob o controle do promotor da queratina-5 (K5) nos queratinócitos epidérmicos e foliculares pilosos de camundongos, foram gerados para estabelecer um modelo de animal para TEN. As células T CD8⁺ específicas de OVA, quando adotivamente transferidas em camundongos K5-OVA, passam pela ativação e proliferação nos linfonodos que drenam a pele e alvejam a pele de camundongos K5-OVA, resultando no desenvolvimento de lesões de pele que são similares de TEN. Ver Azukizawa H., *et al.*, Eur J Immunol: 33, 1879 (2003).

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos podem ser usados para melhorar o resultado clínico de TEN pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Pênfigo bolhoso

O pênfigo bolhoso é um distúrbio subepidérmico que se

manifesta como bolhas subepidérmicas com um infiltrado dérmico de neutrófilos e eosinófilos. O diagnóstico é caracterizado pela presença de anticorpos específicos de antígeno contra as proteínas de adesão específicas da epiderme e junção dérmica-epidérmica. Ver Jordon R. E., *et al.*, JAMA: 200, 751 (1967). Os estudos que analisam o papel das células T na patogênese do pênfigo bolhoso pela análise de PBL e células T das bolhas da pele têm encontrado uma predominância de células T CLA⁺ que expressam níveis aumentados de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13. Ver Teraki Y., *et al.*, J Invest Dermatol: 117, 1097 (2001). Em pacientes com pênfigo bolhoso a seguir da terapia com corticosteróides sistêmicos, a frequência de células CLA⁺, mas não de células produtoras de interleucina-13 CLA⁻ é significativamente diminuída. As diminuições nas células CLA⁺ a seguir do tratamento com corticosteróide está associada com a melhora clínica. Ver Teraki, *ibid.*

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico de pênfigo bolhoso pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Alopecia areata

A alopecia areata (AA) é considerada como uma doença autoimune restrita a tecido de folículos pilosos em que a atividade folicular é impedida por causa da atividade contínua de infiltrados linfocíticos. AA resulta em pedaços e perda de cabelo completa em qualquer lugar do corpo, embora a perda de real dos folículos pilosos não ocorra, mesmo em lesões sem cabelo. Embora os sinais clínicos de inflamação estejam ausentes, as biópsias de pele de sítios de doença ativa mostram inflamação linfocítica perifolicular de células primariamente CD4⁺, junto com um infiltrado intrafolicular de CD8⁺. Ver Kalish R. S. & Gilhar A. J Invest Dermatol Symp Proc: 8, 164 (2003).

Estudos têm mostrado que os linfócitos CD4+ ou CD8+ que infiltram a pele do escalpo expressam CLA e, no sangue periférico de indivíduos com AA, a porcentagem de linfócitos CLA+ CD4+ ou CD8+ é significativamente mais alta do que aquela de controles normais. Além disso, pacientes com AA severa ou progressiva mostram uma positividade de CLA muito mais alta comparada com pacientes que se recuperam da doença e uma diminuição no percentual de células CLA+ se compara com um bom curso clínico. Ver Yano S., *et al.*, Acta Derm Venereol: 82, 82 (2002). Estes estudos portanto sugerem que os linfócitos CLA+ podem desempenhar um papel importante na AA. Modelos de xenoenxerto têm demonstrado que as células T ativadas são prováveis de desempenhar um papel na patogênese da AA. O escalpo lesional de pacientes AA enxertados em camundongos nus faz crescer novamente o cabelo coincidente com uma perda de linfócitos infiltrantes do enxerto e, a transferência de células T lesionais ativadas aos camundongos SCID pode transferir a perda de cabelo para os explantes de escalpo humano em camundongos SCID. Ver Kalish R. S. & Gilhar A. J Invest Dermatol Symp Proc: 8, 164 (2003).

Uma variedade de terapias imunomoduladoras são parte do tratamento usual para este distúrbio entretanto nenhum destes tratamentos foram consistentes em sua eficácia. Ver Tang L., *et al.*, J Invest Dermatol: 120, 400 (2003); Tang L., *et al.*, (2004); e Tang L., *et al.*, J Am Acad Dermatol: 49, 1013 (2003). Não obstante, seus usos em modelos de animal válidos fornecem uma ferramenta para dissecar mecanismos moleculares de efeitos terapêuticos. Ver Shapiro J., *et al.*, J Invest Dermatol Symp Proc: 4, 239 (1999); Tang L., *et al.*, Old wine in new bottles: reviving old therapies for alopecia areata using rodent models (2003); e Verma D. D., *et al.*, Eur J Dermatol: 14, 332 (2004).

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos podem ser usados para melhorar o resultado clínico da alopecia

areata pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Acne Rosácea/Acne vulgar

5 A acne vulgar, um distúrbio do aparelho pilossebáceo, é o problema de pele mais comum da adolescência. As anormalidades na queratinização folicular são consideradas produzir a lesão da acne. A acne rosácea é diferenciada da acne vulgar pela presença de pápulas vermelhas, pústulas, cistos e telangiectasias extensivas, mas a ausência de comedones (cabeças brancas). A excreção de sebo aumentada das glândulas sebáceas é
10 um fator principal na patofisiologia da acne vulgar. Outras funções da glândula sebácea também são associadas com o desenvolvimento de acne, incluindo lipídeos pró inflamatórios sebáceos; citocinas diferentes localmente produzidas; peptídeos periglandulares e neuropeptídeos, tais como o hormônio que libera a corticotrofina, que é produzido pelos sebócitos; e
15 substância P, que é expressada nas extremidades nervosas na proximidade de glândulas que parecem saudáveis de pacientes com acne. Ver Zouboulis C. C. Clin Dermatol: 22, 360 (2004).

Embora a fisiopatologia da acne vulgar e da acne rosácea permaneça desconhecida, as observações clínicas e estudos histopatológicos
20 sugerem que a inflamação dos folículos pilossebácicos pode ser central para a patogênese das acnes rosácea e vulgar. Estudos antigos sobre a análise de subconjuntos de célula T que infiltram lesões de rosácea indicam que a maioria das células T expressaram CD4. Ver Ruffli T. & Buchner S. A. Dermatologica: 169, 1 (1984).

25 As células T CD4⁺ produzem IL-31 e a análise de IHC de pele quanto a expressão de IL-31 sugere que IL-31 é expressada em glândulas sebáceas e sudoríparas. A estimulação de IL-31 de queratinócitos epidérmicos induz a expressão de quimiocinas que provavelmente resultam em infiltração celular sugerindo que a IL-31 possa contribuir com a resposta pró-

inflamatória na pele. Ver Dillon S. R., *et al.*, Nat Immunol: 5, 752 (2004). A IL-31 portanto pode contribuir para a fisiopatologia da acne rosácea e acne vulgar.

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico da acne vulgar pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associadas com a doença.

Prurigo nodular

Prurigo nodular é uma erupção de nódulos liquenificados ou escoriados causada pelo prurido intratável que é difícil de tratar. Embora a esfregação crônica resulte em liquenificação e coceira em escoriações lineares, indivíduos que descarna e arranca a sua coceira, a pele irritada tende a produzir pápulas acentuadamente espessas conhecidas como nódulos de prurigo. Embora o prurigo nodular não seja específico da dermatite atópica, muitos pacientes com estes nódulos também têm uma reação atópica, que se manifesta como rinite alérgica, asma ou alergia alimentar. As células T representam a maioria das células infiltrantes nas lesões de prurigo e estas lesões freqüentemente representam lesão de pele mais prurítica em paciente de atopia.

O tratamento tópico do prurigo nodular com capsaicina, um alcalóide anti-prurítico que interfere com a percepção de pruridos e dor pelo esgotamento de neuropeptídeos como a substância P em nervos cutâneos sensoriais pequenos, tem mostrado ser um regime eficaz e seguro que resulta em liquidação das lesões de pele. Ver Stander S., *et al.*, J Am Acad Dermatol: 44, 471 (2001). Estudos da resposta à coceira em camundongos NC/Nga usando tratamento com capsaicina mostrou que o desenvolvimento espontâneo de lesões de dermatite foi quase completamente evitado. Além disso, a elevação dos níveis de IgE séricos foi significativamente suprimida e os números de eosinófilos infiltrantes e mastóides na pele lesional de

camundongos tratados com capsaicina foram reduzidos. Ver Mihara K., *et al.*, Br J Dermatol: 151, 335 (2004). As observações deste grupo sugerem que o comportamento de coceira contribuiria para o desenvolvimento de dermatite pelo realce de várias respostas imunológicas, implicando portanto que a prevenção da sensação de coceira e/ou comportamento de coçar associado com a coceira seria um tratamento eficaz para a AD. Ver Mihara K., *et al.*, Br J Dermatol: 151, 335 (2004). Assim, os anticorpos anti-IL-31 aqui descritos serão úteis em minimizar os efeitos de AD, prurigo nodular e outras doenças pruríticas visto que são mostrados aqui reduzir a quantidade de coceira em camundongos NC/Nga.

A liberação crônica de IL-31 induz o prurido e a alopecia em camundongos seguido pelo desenvolvimento de lesões de pele que se parecem com a dermatite sugerindo que IL-31 pode induzir a coceira. Ver Dillon S. R., *et al.*, Nat Immunol: 5, 752 (2004). O envolvimento de IL-31 foi testado na indução da resposta à coceira pelos dois métodos (i) tratamento com capsaicina de camundongos tratados com IL-31 e (ii) tratamento com IL-31 de camundongos silenciados em *Tac1*, que reduziram significativamente as respostas à dor nociceptivas por causa da falta de expressão de neuropeptídeos no Exemplo 52. Além disso, se a neutralização de IL-31 em camundongos tratados com IL-31 poderia prevenir o prurido e a alopecia foi testado no Exemplo 12.

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico de prurigo nodular pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associados com a doença.

Vírus Trópico de Pele e Prurido Associado com Vírus

As células T CD8⁺ específicas do Vírus Simples do Herpes (HSV) no sangue periférico e células T CD8⁺ específicas do HSV recuperadas de lesões herpéticas expressam níveis altos de CLA onde visto

que as células T CD8⁺ específicas do vírus do herpes não trópicas de pele carecem da expressão de CLA. Ver Koelle D. M., *et al.*, J Clin Invest: 110, 537 (2002). Os linfócitos T CD4⁺ reativos em HSV-2 também expressam CLA, mas em níveis mais baixos do que aqueles previamente observados para linfócitos T CD8⁺. Ver Gonzalez J. C., *et al.*, J Infect Dis: 191, 243 (2005). O prurido também foi associado com as infecções virais herpéticas (Ver Hung K. Y., *et al.*, Blood Purif: 16, 147 (1998). embora outras doenças virais, como o HIV, também tenham sido associadas com lesões de pele pruríticas. O prurido grave, intratável freqüentemente associado com lesões de pele eritematopapular e hipereosinofilia, é um condição observada em alguns pacientes nonatópicos, infectados com HIV 36. Ver Singh F. & Rudikoff D, Am J Clin Dermatol; 4, 177 (2003); e Milazzo F., Piconi S., *et al.*, Allergy: 54, 266 (1999).

A associação de vírus trópico de pele com prurido e células T CLA⁺ sugere que as células T que produzem IL-31 podem ser envolvidas na patofisiologia de infecções virais.

Assim, a neutralização de IL-31 pelos anticorpos aqui descritos pode ser usada para melhorar o resultado clínico de prurido associado com vírus trópico de pele pela inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou coceira associada com a doença.

Além disso, a inflamação é uma resposta protetora por um organismo para defender-se de um agente invasor. A inflamação é um evento em cascata que envolve muitos mediadores celulares e humorais. Por um lado, a supressão de respostas inflamatórias pode levar a um hospedeiro imunocomprometido; entretanto, se deixada incontrolada, a inflamação pode levar a complicações sérias incluindo doenças inflamatórias crônicas (por exemplo, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença do intestino inflamatório e outros), choque séptico e insuficiência de órgão múltiplo. De maneira importante, estes estados de doença diversos compartilham

mediadores inflamatórios comuns. As doenças coletivas que são caracterizadas pela inflamação têm um impacto grande sobre a morbidez e mortalidade humana. Portanto está claro que anticorpos anti-inflamatórios e polipeptídeos de ligação, tais como anticorpos anti-IL-31 e polipeptídeos de ligação aqui descritos, podem ter potencial terapêutico crucial para um vasto número de doenças humanas e de animal, da asma e alergia até autoimunidade e choque séptico. Como tal, o uso de anticorpos anti-inflamatórios anti-IL-31 e polipeptídeos de ligação aqui descritos podem ser usados terapeuticamente como antagonistas de IL-31 aqui descritos, particularmente em doenças tais como a artrite, endotoxemia, doença do intestino inflamatória, psoríase, doença relacionada e outras.

1. Artrite

A artrite, incluindo a osteoartrite, artrite reumatóide, juntas artríticas como um resultado de lesão e outros, são condições inflamatórias comuns que beneficiar-se-iam do uso terapêutico de anticorpos anti-inflamatórios e polipeptídeos de ligação, tais como anticorpos anti-IL-31 e polipeptídeos de ligação da presente invenção. Por exemplo, a artrite reumatóide (RA) é uma doença sistêmica que afeta o corpo inteiro e é uma das formas mais comuns de artrite. Esta é caracterizada pela inflamação da membrana que reveste a junta, que causa dor, inflexibilidade, quentura, vermelhidão e inchaço. As células inflamatórias liberam enzimas que podem digerir o osso e a cartilagem. Como um resultado da artrite reumatóide, o revestimento da junta inflamada, o sinóvio, pode invadir e danificar o osso e a cartilagem levando à deterioração da junta e dor severa entre outros efeitos fisiológicos. A junta envolvida pode perder a sua forma e alinhamento, resultando em dor e perda de movimento.

A artrite reumatóide (RA) é uma doença mediada pelo sistema imunológico particularmente caracterizada pela inflamação e dano de tecido subsequente levando à incapacidade grave e mortalidade aumentada. Uma

variedade de citocinas são produzidas localmente nas juntas reumatóides. Numerosos estudos têm demonstrado que a IL-1 e TNF-alfa, duas citocinas pró-inflamatórias prototípicas, desempenham um papel importante nos mecanismos envolvidos na inflamação sinovial e na destruição de junta progressiva. De fato, a administração de inibidores de TNF-alfa e de IL-1 em pacientes com RA tem levado a uma melhora dramática de sinais clínicos e biológicos de inflamação e uma redução de sinais radiológicos de erosão óssea e destruição de cartilagem. Entretanto, a despeito destes resultados encorajadores, uma porcentagem significativa de pacientes não respondem a estes agentes, sugerindo que outros mediadores também estejam envolvidos na fisiopatologia da artrite (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002). Um destes mediadores pode ser a IL-31 e como uma tal molécula que se liga ou inibe IL-31, tal como anticorpos anti IL-31 ou parceiros de ligação, podem servir como um produto terapêutico valioso para reduzir a inflamação na artrite reumatóide e outras doenças artríticas.

Existem diversos modelos de animal para a artrite reumatóide conhecidos na técnica. Por exemplo, no modelo de artrite induzido por colágeno (CIA), camundongos desenvolvem a artrite inflamatória crônica que intimamente se parece com a artrite reumatóide humana. Visto que a CIA compartilha características imunológicas e patológicas similares com a RA, isto o torna um modelo ideal para a triagem de compostos anti-inflamatórios para uso humano potenciais. O modelo de CIA é um modelo bem conhecido em camundongos que depende tanto de uma resposta imune quanto de uma resposta inflamatória, de modo a ocorrer. A resposta imune compreende a interação de células B e células T CD4⁺ em resposta ao colágeno, que é dado como antígeno e leva à produção de anticorpos anti-colágeno. A fase inflamatória é o resultado de respostas de tecido a partir de mediadores da inflamação, como uma consequência de alguns destes anticorpos reagirem cruzado com o colágeno nativo do camundongo e ativar a cascata de

complemento. Uma vantagem no uso do modelo de CIA é que os mecanismos básicos de patogênese são conhecidos. Os epítomos de célula T e célula B relevantes no colágeno tipo II foram identificados e vários parâmetros imunológicos (por exemplo, hipersensibilidade do tipo demorada e anticorpo anti-colágeno) e inflamatórios (por exemplo, citocinas, quimiocinas e enzimas que degradam matriz) que dizem respeito à artrite mediada pelo sistema imunológico foram determinados e assim podem ser usados para avaliar a eficácia de compostos de teste no modelo de CIA (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407-20, 1999; Williams *et al.*, Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myers *et al.*, Life Sci. 61: 1861-78, 1997; e Wang *et al.*, Immunol. 92: 8955-959, 1995).

A administração de IL-31RA solúvel que compreende polipeptídeos (incluindo receptores heterodiméricos e multiméricos aqui descritos), tais como IL-31RA-Fc4 ou outra IL-31RA solúvel e proteínas de fusão para estes camundongos modelos de CIA foi usada para avaliar o uso de IL-31RA para melhorar sintomas e alterar o curso de doença. Como uma molécula que modula a resposta imune e inflamatória, IL-31, pode induzir a produção de SAA, que é implicada na patogênese da artrite reumatóide, antagonistas de IL-31 pode reduzir a atividade de SAA *in vitro* e *in vivo*, a administração sistêmica ou local de antagonistas de IL-31 tal como anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação, polipeptídeos que compreendem IL-31RA (incluindo receptores heterodiméricos e multiméricos aqui descritos), tal como IL-31RA-Fc4 ou outra IL-31RA solúvel e proteínas de fusão podem potencialmente suprimir a resposta inflamatória em RA. Outros produtos terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico e multimérico solúvel ou anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros.

2. Endotoxemia

A endotoxemia é uma condição severa comumente resultante

de agentes infecciosos tais como bactérias e outros agentes de doença infecciosos, septicemia, síndrome de choque tóxico ou em pacientes imunocomprometidos submetidos às infecções oportunistas e outros. Terapeuticamente úteis de anticorpos anti-inflamatórios e polipeptídeos de ligação, tais como anticorpos anti-IL-31 e polipeptídeos de ligação da presente invenção, podem ajudar na prevenção e tratamento da endotoxemia em seres humanos e animais. Outros produtos terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico e multimérico solúveis ou anticorpos anti IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros, podem servir como um produto terapêutico valioso para reduzir a inflamação e efeitos patológicos na endotoxemia.

A endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) engrena muitos dos mediadores pró inflamatórios que produzem efeitos patológicos nas doenças infecciosas e a endotoxemia induzida pelo LPS em roedores é um modelo amplamente usado e aceitável para estudar os efeitos farmacológicos de agentes pró-inflamatórios ou imuno-moduladores potenciais. O LPS, produzido em bactérias gram-negativas, é um agente causativo principal na patogênese de choque séptico (Glausner *et al.*, Lancet 338: 732, 1991). Um estado equivalente ao choque pode de fato ser induzido experimentalmente por uma única injeção de LPS em animais. As moléculas produzidas pelas células que respondem ao LPS podem alvejar patógenos direta ou indiretamente. Embora estas respostas biológicas protejam o hospedeiro contra patógenos invasores, elas também podem causar danos. Assim, a estimulação maciça de imunidade inata, que ocorre como um resultado da infecção bacteriana Gram-negativa grave, leva à produção em excesso de citocinas e outras moléculas e ao desenvolvimento de uma síndrome fatal, a síndrome do choque séptico, que é caracterizada por febre, hipotensão, coagulação intravascular disseminada e insuficiência de órgão múltipla (Dumitru *et al.* Cell 103: 1071-1083, 2000).

Estes efeitos tóxicos de LPS são principalmente relacionados com a ativação de macrófago levando à liberação de mediadores inflamatórios múltiplos. Entre estes mediadores, o TNF parece desempenhar um papel crucial, como indicado pela prevenção de toxicidade de LPS pela administração de anticorpos anti-TNF neutralizantes (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). Está bem estabelecido que a injeção de 1 µg de LPS de *E. coli* em um camundongo C57Bl/6 resultará em aumentos significantes em IL-6, TNF-alfa, IL-1 circulantes e proteínas de fase aguda (por exemplo, SAA) aproximadamente 2 horas após a injeção. A toxicidade de LPS parece ser mediada por estas citocinas visto que a imunização passiva contra estes mediadores pode resultar em mortalidade diminuída (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). As estratégias de imunointervenção potenciais para a prevenção e/ou tratamento de choque séptico incluem mAb anti-TNF, antagonista do receptor de IL-1, LIF, IL-10 e G-CSF. Visto que LPS induz a produção de fatores pró-inflamatórios possivelmente contribuindo para a patologia da endotoxemia, a neutralização da atividade de IL-31, SAA ou de outros fatores pró-inflamatórios pela antagonização do polipeptídeo IL-31 pode ser usada para reduzir os sintomas de endotoxemia, tais como os observados no choque endotóxico. Outros produtos terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico e multimérico solúveis ou anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros.

3 Doença do Intestino Inflamatório. IBD

Nos Estados Unidos aproximadamente 500.000 pessoas sofrem de Doença do Intestino Inflamatório (IBD) que pode afetar o cólon e o reto (Colite Ulcerativa) ou ambos, os intestinos delgado e grosso (Doença de Crohn). A patogênese destas doenças é incerta, mas elas envolvem a inflamação crônica dos tecidos afetados. Os produtos terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico

e multimérico solúveis ou anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros., podem servir como um produto terapêutico valioso para reduzir a inflamação e efeitos patológicos em IBD e doenças relacionadas.

5 A colite ulcerativa (UC) é uma doença inflamatória do intestino grosso, habitualmente chamado de cólon, caracterizado pela inflamação e ulceração da mucosa ou revestimento mais profundo do cólon. Esta inflamação faz com que o cólon esvazie freqüentemente, resultando em diarreia. Os sintomas incluem a soltura das fezes e espasmos abdominais, febre e perda de peso associados. Embora a causa exata da UC seja desconhecida, pesquisa recente sugere que as defesas naturais do corpo estejam operando contra as proteínas no corpo que o corpo pensa que são estranhas (uma “reação autoimune”). Talvez porque elas se parecem com as proteínas bacterianas no intestino, estas proteínas podem instigar ou estimular o processo inflamatório que começa a destruir o revestimento do cólon. Visto que o revestimento do cólon é destruído, úlceras se formam liberando muco, pús e sangue. A doença usualmente começa na área retal e pode eventualmente estender-se através do intestino grosso inteiro. Episódios repetidos de inflamação levam ao espessamento da parede do intestino e reto com tecido cicatricial. A morte de tecido do cólon ou septicemia pode ocorrer com a doença grave. Os sintomas de colite ulcerativa variam em gravidade e seu início pode ser gradual ou súbito. Os ataques podem ser provocados por muitos fatores, incluindo infecções respiratórias ou estresse.

25 Embora correntemente não exista nenhuma cura para a UC disponível, os tratamentos são focalizados na supressão do processo inflamatório anormal no revestimento do cólon. Tratamentos incluindo imunossupressivos de corticosteróides (por exemplo, azatioprina, mercaptopurina e metotrexato) e aminossalicilatos estão disponíveis para tratar a doença. Entretanto, o uso de longa duração de imunossupressivos tais

como corticosteróides e azatioprina pode resultar em sérios efeitos colaterais incluindo redução de ossos, cataratas, infecção e efeitos hepáticos e na medula óssea. Nos pacientes nos quais as terapias correntes não são bem sucedidas, a cirurgia é uma opção. A cirurgia envolve a remoção do cólon inteiro e do reto.

Existem modelos de animal graves que podem imitar parcialmente a colite ulcerativa crônica. O modelo mais amplamente usado é o modelo de colite induzido pelo ácido 2,4,6-trinitrobeno-sulfônico/etanol (TNBS), que induz a inflamação crônica e ulceração no cólon. Quando TNBS é introduzido no cólon de camundongos suscetíveis por intermédio da instilação intra-retal, o mesmo induz a resposta imune mediada pela célula T na mucosa colônica, neste caso levando a uma inflamação mucósica maciça caracterizada pela infiltração densa de células T e macrófagos por toda a parede inteira do intestino grosso. Além disso, este quadro histopatológico é acompanhado pelo quadro clínico de perda de peso progressiva (debilitamento), diarreia sangüinolenta, prolapso retal e espessamento da parede do intestino grosso (Neurath *et al.* Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000).

Um outro modelo de colite usa o sulfato de dextrano sódico (DSS), que induz uma colite aguda manifestada pela diarreia sangüinolenta, perda de peso, encurtamento do cólon e ulceração da mucosa com infiltração neutrofilica. A colite induzida pelo DSS é caracterizada histologicamente pela infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, com hiperplasia linfóidica, dano do folículo focal e ulceração epitelial. Considera-se que estas mudanças se desenvolvam devido a um efeito tóxico do DSS sobre o epitélio e pela fagocitose das células da lâmina própria e produção de TNF-alfa e IFN-gama. Apesar do seu uso comum, diversos problemas com respeito aos mecanismos de DSS a cerca da relevância para a doença humana permanecem não resolvidos. O DSS é visto como um modelo independente de célula T

porque o mesmo é observado em animais deficientes em célula T tais como camundongos SCID.

A administração de anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação, polipeptídeos que compreendem IL-31RA solúvel (incluindo receptores heterodiméricos e multiméricos), tais como IL-31RA-Fc4 ou outro IL-31RA solúvel e proteínas de fusão para estes modelos de TNBS ou DSS podem ser usados para avaliar o uso de antagonistas de IL-31 para melhorar sintomas e alterar o curso da doença gastrointestinal. IL-31 pode desempenhar um papel na resposta inflamatória na colite e a neutralização da atividade de IL-31 pela administração de antagonistas de IL-31 é um método terapêutico potencial para IBD. Outros produtos terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico e multimérico solúveis ou anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros.

4. Psoríase

A psoríase é uma condição de pele crônica que afeta mais do que sete milhões de americanos. A psoríase ocorre quando novas células de pele crescem de modo anormal, resultando em pedaços inflamados, inchados e escamosos de pele onde a pele velha não caiu rápido o bastante. A psoríase de placa, a forma mais comum, é caracterizada por pedaços inflamados de pele (“lesões”) encimadas com escamas brancas prateadas. A psoríase pode ser limitada a umas poucas placas ou envolve áreas moderadas a extensivas de pele, aparecendo mais habitualmente no couro cabeludo, joelhos, cotovelos e tronco. Embora seja altamente visível, a psoríase não é uma doença contagiosa. A patogênese das doenças envolve a inflamação crônica dos tecidos afetados. Os polipeptídeos de IL-31RA, polipeptídeos de receptor heterodimérico e multimérico solúveis ou anticorpos anti-IL-31 ou parceiros de ligação da presente invenção e outros, podem servir como um produto terapêutico valioso para reduzir a inflamação e efeitos patológicos na

psoríase, outras doenças de pele inflamatórias, alergias de pele e mucósicas e doenças relacionadas.

5 A psoríase é um distúrbio inflamatório mediado pela célula T da pele que pode causar desconforto considerável. Esta é uma doença para a qual não existe nenhuma cura e afeta pessoas de todas as idades. A psoríase afeta aproximadamente dois por cento das populações da Europa e América do Norte. Embora indivíduos com psoríase branda possam freqüentemente controlar a sua doença com agentes tópicos, mais do que um milhão de pacientes no mundo requerem ultravioleta ou terapia imunossupressiva
10 sistêmica. Infelizmente, a inconveniência e os riscos da radiação ultravioleta e a toxicidade de muitas terapias limitam o seu uso de longa duração. Além disso, os pacientes usualmente têm retorno da psoríase e em alguns casos r

A IL-31 foi isolada de tecido conhecido ter função imunológica importante e que contém células que desempenham um papel no
15 sistema imune. A IL-31 é expressada em células de sangue periférico selecionadas em CD3+, ativadas e foi mostrado que a expressão de IL-31 aumenta depois da ativação de célula T. Além disso, resultados de experimentos descritos na seção de Exemplos aqui sugerem que os polipeptídeos da presente invenção podem ter um efeito sobre o
20 crescimento/expansão de monócitos/macrófagos, células T, células B, células NK e/ou estados diferenciados de monócitos/macrófagos, células T, células B, células NK ou estes progenitores das células. Os fatores que tanto estimulam a proliferação de progenitores hematopoiéticos quanto ativam as células maduras são no geral conhecidos, entretanto, a proliferação e ativação
25 também pode requerer fatores de crescimento adicionais. Por exemplo, foi mostrado que IL-7 e o Fator *Steel* (ligando *c-kit*) foram requeridos para a formação de colônia de progenitores NK. IL-15 + IL-2 em combinação com IL-7 e o Fator *Steel* foram mais eficazes (Mrózek *et al.*, Blood 87: 2632-2640, 1996). Entretanto, citocinas não identificadas podem ser necessárias para a

proliferação de subconjuntos específicos de células NK e/ou progenitores de NK (Robertson *et al.*, Blood 76: 2451-2438, 1990). Similarmente, IL-31 pode atuar sozinha ou de comum acordo ou em sinergia com outras citocinas para realçar o crescimento, proliferação expansão e modificação da diferenciação de monócitos/macrófagos, células T, células B ou células NK.

A presente invenção fornece um método para inibir a ativação ou diferenciação de monócitos/macrófagos. Os monócitos são células incompletamente diferenciadas que migram a vários tecidos onde eles amadurecem e se tornam macrófagos. Os macrófagos desempenham um papel central na resposta imune pela apresentação de antígeno aos linfócitos e desempenham um papel suporte como células acessórias aos linfócitos pela secreção de numerosas citocinas. Os macrófagos podem internalizar moléculas extracelulares e na ativação têm uma capacidade aumentada para matar microorganismos intracelulares e células de tumor. Os macrófagos ativados também estão envolvidos na estimulação aguda ou inflamação local.

A distribuição em tecido de receptores para uma dada citocina oferece uma forte indicação dos sítios potenciais de ação daquela citocina. A expressão de IL-31RA foi observada em monócitos e células B, com um aumento dramático de expressão na ativação de células T CD3+, CD4+ e CD8+. Além disso, duas linhagens de célula monocíticas, THP-1 (Tsuchiya *et al.*, Int. J. Cancer 26: 171-176, 1980) e U937 (Sundstrom *et al.*, Int. J. Cancer 17: 565-577, 1976), também foram positivos quanto a expressão de IL-31RA.

A expressão de OSMR é relatada ser muito ampla (Mosley *et al.*, JBC 271: 32635-32643, 1996). Esta distribuição de receptores de IL-31RA e OSM sustenta um papel para IL-31 em respostas imunes, especialmente a expansão de células T na ativação ou um papel no braço de monócito/macrófago do sistema imune.

Assim, as formas de realização particulares da presente invenção são direcionadas ao uso de heterodímeros de IL-31RA/OSMR

solúveis como antagonistas nas doenças ou condições inflamatórias e imunes tais como pancreatite, diabetes tipo I (IDDM), câncer pancreático, pancreatite, Doença de Graves, doença do intestino inflamatório (IBD), Doença de Crohn, câncer colônico e intestinal, diverticulose, doença autoimune, septicemia, transplante de órgão ou medula óssea; inflamação devido ao trauma, cirurgia ou infecção; amiloidose; esplenomegalia; doença do enxerto versus hospedeiro; e onde a inibição da inflamação, supressão imune, redução da proliferação de células hematopoiéticas, imunes, inflamatórias ou linfóides, macrófagos, células T (incluindo células Th1 e Th2, células CD4+ e CD8+), supressão de resposta imune a um patógeno ou antígeno. Além disso a presença de expressão de IL-31RA em células imunes ativadas tais como células CD4+ e CD19+ ativadas mostrou que o receptor de IL-31RA pode estar envolvido nas reações imuno defensivas do corpo contra invasores estranhos: tais como microorganismos e fragmentos celulares e podem desempenhar um papel em respostas imunes durante a inflamação e formação de câncer. Como tais, os anticorpos e parceiros de ligação da presente invenção que são agonísticos ou antagonísticos para a função receptora de IL-31RA, tal como IL-31, podem ser usados para modificar a resposta imune e a inflamação.

A IL-31 pode encontrar utilidade na supressão do sistema imune, tal como no tratamento de doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla, diabetes melito, doença do intestino inflamatório, doença de Crohn, etc. A supressão imune também pode ser usada para reduzir a rejeição de transplantes de tecido ou órgão e enxertos e para tratar leucemias ou linfomas específicos de célula T, célula B ou monócito e outros cânceres, pela inibição da proliferação do tipo de célula afetada. Além disso a IL-31 pode ser usada para detectar monócitos, macrófagos e células T ativadas e ajudar no diagnóstico de tal doença autoimune, particularmente em estados de doença onde os monócitos são elevados ou

ativados.

Os polipeptídeos, peptídeos, anticorpos IL-31 e outros também podem ser usados dentro de sistemas de diagnóstico para a detecção de níveis circulatórios de IL-31. Dentro de uma forma de realização relacionada, os anticorpos ou outros agentes que especificamente se ligam aos polipeptídeos IL-31 podem ser usados para detectar polipeptídeos de IL-31 circulantes. Os níveis elevados ou diminuídos de polipeptídeos de ligando podem ser indicativos de condições patológicas, incluindo o câncer. Os polipeptídeos de IL-31 podem contribuir para processos patológicos e podem ser um marcador indireto de uma doença subjacente.

Além disso, uma pessoa de habilidade na técnica reconheceria que os antagonistas de IL-31 são úteis. Por exemplo, em lesões ateroscleróticas, uma das primeiras anormalidades é a localização de monócito/macrófagos nas células endoteliais. Estas lesões podem ser prevenidas pelo uso de antagonistas para IL-31. Anticorpos anti-IL-31 (por exemplo, anticorpo neutralizador de IL-31), receptores de IL-31RA solúveis, heterodímeros e multímeros e parceiros de ligação de IL-31 também podem ser usados como antagonistas para a IL-31. Além disso, a leucemia monoblástica está associada com uma variedade de anormalidades clínicas que refletem a liberação dos produtos biológicos do macrófago, os exemplos incluem níveis altos de lisozima no soro e urina e febres altas. Além disso, tais leucemias exibem um aumento anormal de células monocíticas. Estes efeitos podem ser possivelmente prevenidos pelos antagonistas para IL-31, tais como aqui descritos. Além disso, anti-IL-31 pode ser conjugado com moléculas tais como porções tóxicas e citocinas, como aqui descrito para direcionar a morte de células monocíticas da leucemia.

Visto que a IL-31 é expressada em uma maneira específica de célula T, macrófago e monócito e estas doenças envolvem anormalidades em células monocíticas, tais como a proliferação, função, localização e ativação

de célula, os polinucleotídeos, polipeptídeos e anticorpos da presente invenção podem ser usados como diagnósticos para detectar tais anormalidades de célula monocítica e indicam a presença de doença. Tais métodos envolvem coletar uma amostra biológica de um paciente, tal como sangue, saliva ou biópsia e compará-la com uma amostra de controle normal. 5 Histológico, citológico, citométrico de fluxo, bioquímico e outros métodos podem ser usados para determinar os níveis relativos ou localização de IL-31 ou células que expressam IL-31, isto é, monócitos, na amostra do paciente comparados com o controle normal. Uma mudança no nível (aumento ou 10 diminuição) da expressão de IL-31 ou uma mudança no número ou localização de monócitos (por exemplo, aumento ou infiltração de células monocíticas em tecidos onde eles normalmente não estão presentes) comparado a um controle seria indicativo de doença. Tais métodos de diagnóstico também podem incluir o uso de rótulos radiométrico, 15 fluorescentes e colorimétricos ligados aos polinucleotídeos, polipeptídeos ou anticorpos da presente invenção. Tais métodos são bem conhecidos na técnica e aqui divulgados.

A IL-31 mostrou ser expressada em células mononucleares ativadas e podem estar envolvidas na regulação da inflamação. Como tal, os 20 polipeptídeos da presente invenção podem ser ensaiados e usados quanto a sua capacidade para modificar a inflamação ou podem ser usados como um marcador para a inflamação. Os métodos para determinar as qualidades pró inflamatórias e antiinflamatórias de IL-31 são conhecidos na técnica e aqui debatidos. Além disso, estes podem estar envolvidos na super-regulação da 25 produção de reagentes de fase aguda, tais como amiloide A sérica (SAA), α 1-antiquimiotripsina e haptoglobina e que a expressão de ligando receptor de IL-31RA pode ser aumentada na injeção de lipopolissacarídeo (LPS) *in vivo* que estão envolvidas na resposta inflamatória (Dumoutier, L. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000). A produção de proteínas de fase

aguda, tal como SAA, é considerada um mecanismo de sobrevivência de curta duração onde a inflamação é benéfica; entretanto, a manutenção de proteínas de fase aguda por períodos mais longos contribui para a inflamação crônica e pode ser nociva para a saúde humana. para revisão, ver Uhlar, CM e
5 Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999 e Baumann H. e Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994. Além disso, a proteína SAA de fase aguda é implicada na patogênese de diversas doenças inflamatórias crônicas, é implicada na aterosclerose e artrite reumatóide e é a precursora para a proteína amilóide A depositada na amiloidose (Uhlar, CM e
10 Whitehead, supra.). Assim, onde um ligando tal como IL-31 que atua como uma molécula pró-inflamatória e induz a produção de SAA, os antagonistas seriam úteis no tratamento de doença inflamatória e outras doenças associadas com as proteínas de resposta na fase aguda induzidas pelo ligando. Tais antagonistas são fornecidos pela presente invenção. Por exemplo, um método
15 de reduzir a inflamação compreende administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de IL-31 ou anticorpo anti-IL-31 (por exemplo, anticorpo neutralizador) que seja suficiente para reduzir a inflamação. Além disso, um método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação pode compreender: (1) determinar um nível
20 de proteína amilóide A sérica; (2) administrar uma composição que compreenda um polipeptídeo de IL-31 ou anticorpo anti-IL-31 como aqui descritos em um carregador farmacologicamente aceitável; (3) determinar um nível após a administração de proteína de amilóide A sérica; (4) comparar o nível de proteína amilóide A sérica na etapa (1) com o nível de proteína
25 amilóide A sérica na etapa (3), em que uma falta de aumento ou uma diminuição no nível de proteína amilóide A sérica são indicativos de supressão de uma resposta inflamatória.

Como a IL-31, a análise da distribuição em tecido do mRNA que corresponde ao seu cDNA do receptor de IL-31RA mostrou que o nível

de mRNA foi mais alto em monócitos e células prostáticas e é elevado em monócitos ativados e células CD4⁺ ativadas, CD8⁺ ativadas e CD3⁺ ativadas. Por este motivo, o receptor de IL-31RA também está implicado na indução de resposta inflamatória e imune. Assim, as formas de realização particulares da presente invenção são direcionadas ao uso de anticorpos IL-31 e IL-31, assim como heterodímeros receptores de IL-31RA solúveis como antagonistas em doenças ou condições inflamatórias e imunes tais como, pancreatite, diabetes tipo I (IDDM), câncer pancreático, pancreatite, Doença de Graves, doença do intestino inflamatório (IBD), Doença de Crohn, câncer colônico e intestinal, diverticulose, doença autoimune, septicemia, transplante de órgão ou medula óssea; inflamação devido a trauma, cirurgia ou infecção; amiloidose; esplenomegalia; doença do enxerto versus hospedeiro; e onde a inibição de inflamação, supressão imune, redução da proliferação de células hematopoiéticas, imune, inflamatórias ou linfóidicas, macrófagos, células T (incluindo células Th1 e Th2, CD4⁺ e CD8⁺), supressão de resposta imune a um patógeno ou antígeno. Além disso a presença de receptor de IL-31RA e expressão de IL-31 em células imunes ativadas tais como células CD3⁺, monócitos, CD4⁺ e CD19⁺ ativadas mostrou que o receptor IL-31RA pode estar envolvido nas reações imuno defensivas do corpo contra invasores estranhos: tais como microorganismos e fragmentos celulares e podem desempenhar um papel em respostas imunes durante a formação da inflamação e câncer. Como tal, IL-31 e anticorpos IL-31 da presente invenção que são agonísticos ou antagonísticos para a função receptora de IL-31RA, podem ser usados para modificar a resposta imune e a inflamação.

Os polipeptídeos de IL-31 que se ligam aos polipeptídeos receptores de IL-31RA e anticorpos para estes são úteis para:

1) Antagonizar ou bloquear a sinalização por intermédio de receptores que compreendem IL-31RA no tratamento de inflamação aguda, inflamação como um resultado de trauma, lesão de tecido, cirurgia,

septicemia ou infecção e doenças inflamatórias crônicas tais como asma, doença do intestino inflamatório (IBD), colite crônica, esplenomegalia, artrite reumatóide, episódios inflamatórios agudos recorrentes (por exemplo, tuberculose) e tratamento de amiloidose e aterosclerose, Doença de Castleman, asma e outras doenças associadas com a indução de resposta de fase aguda.

2) Antagonizar ou bloquear a sinalização por intermédio dos receptores do receptor de IL-31RA no tratamento de doenças autoimunes tais como IDDM, esclerose múltipla (MS), Lupo eritematoso sistêmico (SLE), miastenia grave, artrite reumatóide e IBD para prevenir ou inibir a sinalização em células imunes (por exemplo linfócitos, monócitos, leucócitos) por intermédio do receptor de IL-31RA (Hughes C *et al.*, J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Alternativamente anticorpos, tais como anticorpos monoclonais (MAb) para IL-31, também podem ser usados como um antagonista para esgotar as células imunes não desejadas para tratar doença autoimune. A asma, alergia e outra doença atópica podem ser tratadas com um MAb contra, por exemplo, anticorpos anti-IL-31, receptores solúveis do receptor de IL-31RA solúvel ou heterodímeros IL-31RA/CRF2-4, para inibir a resposta imune ou para esgotar células ofensivas. O bloqueio ou inibição da sinalização por intermédio de IL-31RA, usando os polipeptídeos e anticorpos da presente invenção, também podem beneficiar doenças do pâncreas, rim, pituitária e células neuronais. IDDM, NIDDM, pancreatite e carcinoma pancreáticos podem ter benefícios. IL-31RA pode servir como um alvo para a terapia de MAb de câncer onde um MAb antagonizador inibe o crescimento de câncer e alveja a morte mediada pelo sistema imune. (Holliger P e Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Mabs para monômeros, homodímeros, heterodímeros e multímeros do receptor de IL-31RA solúvel também podem ser úteis para tratar nefropatias tais como glomeruloesclerose, neuropatia membranosa, amiloidose (que também afeta

os rins entre outros tecidos), arteriosclerose renal, glomerulonefrite de várias origens, doenças fibroproliferativas dos rins, assim como disfunção renal associada com SLE, IDDM, diabetes tipo II (NIDDM), tumores renais e outras doenças.

5 3) Agonizar ou iniciar a sinalização por intermédio dos receptores de IL-31RA no tratamento de doenças autoimunes tais como IDDM, MS, SLE, miastenia grave, artrite reumatóide e IBD. A IL-31 pode sinalizar linfócitos ou outras células imunes para diferenciar, alterar a proliferação ou mudar a produção de citocinas ou proteínas de superfície celular que melhoram a autoimunidade. Especificamente, a modulação de
10 uma resposta de célula auxiliar T a um padrão alternado de secreção de citocina pode desviar uma resposta autoimune para melhorar doença (Smith JA *et al.*, *J. Immunol.* 160: 4841-4849, 1998). Similarmente, a IL-31 pode ser usada para sinalizar, esgotar e desviar as células imunes envolvidas na asma,
15 doença alérgica e atópica. A sinalização por intermédio do receptor de IL-31RA também pode beneficiar doenças do pâncreas, rim, pituitária e células neuronais. IDDM, NIDDM, pancreatite e carcinoma pancreático pode se beneficiar. O IL-31RA pode servir como um alvo para a terapia de MAb de câncer pancreático onde uma sinalização de MAb inibe o crescimento de
20 câncer e alveja a morte mediada por imune (Tutt, AL *et al.*, *J Immunol.* 161: 3175-3185, 1998). Similarmente as leucemias específicas de célula T, linfomas, discrasia de célula plasmática (por exemplo, mieloma múltiplo) e carcinoma podem ser tratadas com anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpo neutralizantes) para receptores solúveis que compreendem IL-31RA
25 da presente invenção.

Os anticorpos anti-IL-31, polipeptídeos do receptor IL-31RA solúvel monomérico, homodimérico, heterodimérico e multimérico aqui descritos podem ser usados para neutralizar/bloquear a atividade do ligando do receptor de IL-31RA no tratamento de doença autoimune, doença atópica,

NIDDM, pancreatite e disfunção renal como descrito acima.

Os anticorpos anti-IL-31 e os receptores que compreendem IL-31RA solúveis são úteis como antagonistas de IL-31. Tais efeitos antagonísticos podem ser obtidos pela neutralização direta ou ligação de seu ligando natural. Além de usos antagonísticos, os receptores solúveis podem ligar IL-31 e atuar como carregadores ou proteínas carregadoras, de modo a transportar IL-31 aos diferentes tecidos, órgãos e células dentro do corpo. Como tal, os receptores solúveis podem ser fundidos ou ligados às moléculas, polipeptídeos ou porções químicas que direcionem o complexo de receptor solúvel-Ligando a um sítio específico, tal como um tecido, célula imune específica, monócitos ou tumor. Por exemplo, na infecção aguda ou alguns cânceres, benefício pode resultar da indução da inflamação e proteínas de resposta de fase aguda local. Assim, os receptores solúveis aqui descritos ou anticorpos da presente invenção podem ser usados para direcionar especificamente a ação de um ligando de IL-31 pró-inflamatória. Ver, Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; e Fernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000.

No geral, a dosagem do polipeptídeo de IL-31 administrado (ou análogo ou proteína de fusão de IL-31RA) variará dependendo de fatores tais como a idade, peso, altura, sexo, condição médica geral e história médica anterior do paciente. Tipicamente, é desejável prover o receptor com uma dosagem de polipeptídeo de IL-31 que esteja na faixa de cerca de 1 µg/kg a 10 mg/kg (quantidade de agente/peso corporal do paciente), embora uma dosagem mais baixa ou mais alta também possa ser administrada conforme as circunstâncias determinem. Uma pessoa habilitada na técnica pode facilmente determinar tais dosagens e ajustes, usando métodos conhecidos na técnica.

A administração de um polipeptídeo de IL-31 a um paciente pode ser tópica, inalante, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intrapleural, intratecal, por perfusão através de um

cateter regional ou pela injeção intralesional direta. Quando da administração de proteínas terapêuticas por injeção, a administração pode ser pela infusão contínua ou pelos bolos únicos ou múltiplos.

As vias adicionais de administração incluem a oral, membrana mucósica, pulmonar e transcutânea. A liberação oral é adequada para as microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas de proteinóide, microesferas de policianoacrilato e sistemas com base em lipídeo (ver, por exemplo, DiBase e Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," em *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders e Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). A praticabilidade de uma liberação intranasal é exemplificada por um tal modo de administração de insulina (ver, por exemplo, Hinchcliffe e Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 199 (1999)). As partículas secas ou líquidas que compreendem IL-31 podem ser preparadas e inaladas com a ajuda de dispersores de pó seco, geradores de aerossol líquido ou nebulizadores (por exemplo, Pettit e Gombotz, *TIBTECH* 16: 343 (1998); Patton *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 235 (1999)). Este método é ilustrado pelo sistema de manuseio de diabetes AERX, que é um inalador eletrônico manual que libera insulina aerossolizada nos pulmões. Os estudos têm mostrado que as proteínas tão grandes quanto 48.000 kDa foram liberadas através da pele em concentrações terapêuticas com a ajuda de ultra-som de baixa frequência, que ilustra a praticabilidade de administração transcutânea (Mitragotri *et al.*, *Science* 269: 850 (1995)). A liberação transdérmica usando eletroporação fornece um outro meio para administrar uma molécula tendo atividade de ligação de IL-31 (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10: 213 (1997)).

Uma composição farmacêutica que compreende uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo tendo atividade de ligação de IL-31 pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmacêuticamente úteis, por meio dos quais as proteínas terapêuticas são

combinadas em uma mistura com um carregador farmacologicamente aceitável. Uma composição é dita ser um “carregador farmacologicamente aceitável” se a sua administração pode ser tolerada por um paciente receptor. A solução salina tamponada com fosfato estéril é um exemplo de um

5 carregador farmacologicamente aceitável. Outros carregadores adequados são bem conhecidos por aqueles na técnica. Ver, por exemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a Edição (Mack Publishing Company 1995).

Para os propósitos de terapia, as moléculas tendo atividade de

10 ligação de IL-31 e um carregador farmacologicamente aceitável são administrados a um paciente em uma quantidade terapêuticamente eficaz. Uma combinação de uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo tendo atividade de ligação de IL-31 e um carregador farmacologicamente aceitável é dito ser

15 administrado em uma “quantidade terapêuticamente aceitável” se a quantidade administrada é fisiologicamente significativa. Um agente é fisiologicamente significativo se a sua presença resulta em uma mudança detectável na fisiologia de um paciente receptor. Por exemplo, um agente usado para tratar inflamação é fisiologicamente significativo se a sua presença alivia pelo menos uma porção da resposta inflamatória.

20 Uma composição farmacêutica que compreende IL-31 (ou análogo ou proteína de fusão de IL-31) pode ser fornecida na forma líquida, em um aerossol ou na forma sólida. As formas líquidas, são ilustradas por soluções injetáveis, aerossóis, gotículas, soluções topológicas e suspensões orais. As formas sólidas exemplares incluem cápsulas, tabletes e formas de

25 liberação controlada. A última forma é ilustrada pelas bombas miniosmóticas e implantes (Bremer *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10: 239 (1997); Ranade, “Implants in Drug Delivery,” em Drug Delivery Systems, Ranade e Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer *et al.*, “Protein Delivery with Infusion Pumps,” em Protein Delivery: Physical Systems, Sanders e

Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey *et al.*, “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant,” em Protein Delivery: Physical Systems, Sanders e Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Outras formas sólidas incluem cremes, pastas, outras
5 aplicações topológicas e outros.

Os anticorpos anti-IL-31 aqui divulgados também podem ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados pelos métodos conhecidos na técnica, tais como descritos em Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*,
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); e Pat. U.S. Nº 4.485.045 e 4.544.545. Os lipossomas com tempo de circulação realçado são divulgados na Pat. U.S. Nº 5.013.556.

Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método da evaporação de fase reversa com uma composição lipídica que
15 compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada em PEG (PEG-PE). Os lipossomas são filtros extrusados de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab's do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas como descrito em Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288
20 (1982) por intermédio de uma reação de intertroca de dissulfeto. Um agente quimioterapêutico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido dentro do lipossoma. Ver Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

As formulações terapêuticas do anticorpo são preparadas para armazenagem misturando-se o anticorpo tendo o grau desejado de pureza com
25 carregadores, excipientes ou estabilizadores fisiologicamente aceitáveis opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os carregadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões tais

como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; os antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes queladores tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra íons formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como Tween[®], Pluronic[®] ou polietileno glicol (PEG).

A formulação aqui também pode conter mais do que um composto ativo como necessário para a indicação particular que é tratada, preferivelmente aquele com atividades complementares que não afetem adversamente um ao outro. Por exemplo, pode ser desejável fornecer ainda anticorpos que se liguem a IL-31 em uma única formulação. Alternativamente ou além disso, a composição pode compreender um agente quimioterapêutico ou uma citocina. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, pelas técnicas de coacervação ou pela polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metacrilato de metila), respectivamente, em sistemas de liberação de medicamento coloidal (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-

partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

5 As formulações a serem usadas para a administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado pela filtração através de membranas de filtração estéril.

As preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, matrizes estas que estão na forma de artigos formados, por exemplo películas ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Pat. U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e.gama. etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinila não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradável tal como o Lupron Depot® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora os polímeros tais como etileno-acetato de vinila e ácido láctico-ácido glicólico possibilita a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo por um tempo longo, eles podem desnaturar ou agregar como um resultado da exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e mudanças possíveis na imunogenicidade. As estratégias racionais podem ser planejadas para a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto ser a formação de ligação S=S intermolecular através da intermudança de tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida pela modificação de resíduos de sulfidrila, liofilização de soluções ácidas, controle do teor de umidade, usando aditivos

apropriados e desenvolvimento de composições de matriz de polímero específico.

Os lipossomas fornecem um meio para liberar polipeptídeos terapêuticos a um paciente intravenosa, intraperitoneal, intratecal, 5 intramuscular, subcutaneamente ou por intermédio da administração oral, inalação ou administração intranasal. Os lipossomas são vesículas microscópicas que consistem de uma ou mais bicamadas lipídicas que circundam compartimentos aquosos (ver, no geral, Bakker-Woudenberg *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1): S61 (1993), Kim, Drugs 46: 10 618 (1993) e Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," em Drug Delivery Systems, Ranade e Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Os lipossomas são similares em composição às membranas celulares e como um resultado, os lipossomas podem ser administrados com segurança e são biodegradáveis. Dependendo do método 15 de preparação, os lipossomas podem ser unilamelares ou multilamelares e os lipossomas podem variar em tamanho com diâmetros variando de 0,02 μm a mais do que 10 μm . Uma variedade de agentes pode ser encapsulada em lipossomas: partição de agentes hidrofóbicos nas bicamadas e partição de agentes hidrofílicos dentro do(s) espaço(s) aquoso(s) interno(s) (ver, por 20 exemplo, Machy *et al.*, Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987) e Ostro *et al.*, American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)). Além disso, é possível controlar a disponibilidade terapêutica do agente encapsulado pela variação do tamanho do lipossoma, do número de bicamadas, composição lipídica, assim como as características de carga e 25 superfície dos lipossomas.

Os lipossomas podem adsorver virtualmente qualquer tipo de célula e depois lentamente liberar o agente encapsulado. Alternativamente, um lipossoma absorvido pode ser endocitado pelas células que são fagocíticas. A endocitose é seguida pela degradação intralissossômica de

lipídeos lipossômicos e a liberação dos agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985)). Depois da administração intravenosa, lipossomas pequenos (0,1 a 1,0 μm) são tipicamente absorvidos pelas células do sistema reticulo-endotelial, localizado principalmente no fígado e baço, ao passo que lipossomas maiores do que 3,0 μm são depositados nos pulmões. Esta absorção preferencial de lipossomas menores pelas células do sistema reticuloendotelial foi usada para liberar agentes quimioterapêuticos aos macrófagos e aos tumores do fígado.

O sistema reticuloendotelial pode ser enganado por diversos métodos incluindo a saturação com doses grandes de partículas de lipossoma ou inativação de macrófago seletivo por meios farmacológicos (Claassen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984)). Além disso, a incorporação de fosfolipídeos derivados de glicolipídeo ou polietileno glicol em membranas de lipossoma mostrou resultar em uma absorção significativamente reduzida pelo sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

Os lipossomas também podem ser preparados para alvejar células ou órgãos particulares variando-se a composição de fosfolipídeo ou pela inserção de receptores ou ligandos nos lipossomas. Por exemplo, lipossomas, preparados com um alto teor de um tensoativo não iônico, foram usados para alvejar o fígado (Hayakawa *et al.*, Patente Japonesa 04-244,018; Kato *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993)). Estas formulações foram preparadas misturando-se fosfatidilcolina de óleo de soja, α -tocoferol e óleo de mamona hidrogenado etoxilado (HCO-60) em metanol, concentrando a mistura sob vácuo e depois reconstituindo a mistura com água. Uma formulação lipossômica de dipalmitoilfosfatidil-colina (DPPC) com uma mistura de esterilglicosídeo derivado de soja (SG) e colesterol (Ch) também foi mostrado alvejar o fígado (Shimizu *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).

Alternativamente, vários ligandos alvejadores podem ser ligados à superfície do lipossoma, tais como anticorpos, fragmentos de anticorpo, carboidratos, vitaminas e proteínas de transporte. Por exemplo, lipossomas podem ser modificados com derivados de galactosilipídeo tipo ramificado para alvejar os receptores de asialoglicoproteína (galactose), que são exclusivamente expressados na superfície das células hepáticas (Kato e Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Similarmente, Wu *et al.*, Hepatology 27: 772 (1998), mostrou que a rotulação de lipossomas com asialofetuína levou a uma meia-vida plasmática de lipossoma encurtada e enormemente realçou a absorção de lipossoma rotulado com asialofetuína pelos hepatócitos. Por outro lado, o acúmulo hepático de lipossomas que compreende derivados de galactosilipídeos tipo ramificado pode ser inibido pela pré injeção de asialofetuína (Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Os lipossomas de albumina sérica humana poliaconitilada fornecem um outro método para alvejar lipossomas às células hepáticas (Kamps *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997)). Além disso, Geho, *et al.* Patente U.S. Nº 4.603.044, descrevem um sistema de liberação de vesícula de lipossoma direcionado a hepatócito, que tem especificidade para receptores hepatobiliares associados com as células metabólicas especializadas do fígado.

Os polipeptídeos tendo atividade de ligação de IL-31 podem ser encapsulados dentro de lipossomas usando técnicas padrão de microencapsulação de proteína (ver, por exemplo, Anderson *et al.*, Infect. Immun. 31: 1099 (1981), Anderson *et al.*, Cancer Res. 50: 1853 (1990) e Cohen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1063: 95 (1991), Alving *et al.* "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," em *Liposome Technology*, 2ª Edição, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, Met. Enzymol. 149: 124 (1987)). Como mencionado

acima, lipossomas terapeuticamente úteis podem conter uma variedade de componentes. Por exemplo, os lipossomas podem compreender derivados lipídicos de poli(etileno glicol) (Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

5 As microesferas de polímero degradável foram planejados para manter altos níveis sistêmicos de proteínas terapêuticas. As microesferas são preparadas a partir de polímeros degradáveis tais como poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLG), polianidridos, poli (orto ésteres), polímeros de acetato de etilvinila não biodegradável, em que as proteínas são aprisionadas no
10 polímero (Gombotz e Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, “Role of Polimers in Drug Delivery,” em Drug Delivery Systems, Ranade e Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos e Maskiewicz, “Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery,” em Proteína Delivery: Physical Systems, Sanders e Hendren (eds.), páginas 45-92
15 (Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, Science 281: 1161 (1998); Putney e Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). As nanoesferas revestidas com polietileno glicol (PEG) também podem fornecer carregadores para a administração intravenosa de proteínas terapêuticas (ver, por exemplo, Gref *et al.*, Pharm. Biotechnol. 10:
20 167 (1997)).

Outras formas de dosagem podem ser desenvolvidas por aqueles habilitados na técnica, como mostrado, por exemplo, por Ansel e Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª Edição (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edição (Mack Publishing Company 1995) e por Ranade e Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).
25

Como uma ilustração, as composições farmacêuticas podem ser fornecidas como um kit compreendendo um recipiente que compreendem um polipeptídeo de IL-31 ou um antagonista de IL-31 (por exemplo, um

anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a um polipeptídeo de IL-31). Os polipeptídeos terapêuticos podem ser fornecidos na forma de uma solução injetável para as doses únicas ou múltiplas ou como um pó esteril que serão reconstituídos antes da injeção. Alternativamente, um tal kit pode incluir um dispensador de pó seco, gerador de aerossol líquido ou nebulizador para a administração de um polipeptídeo terapêutico.

Dentro de um aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que compreende um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830; e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831; f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871; g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873. Dentro de uma forma de realização, o anticorpo neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO: 2) com IL-31RA (SEQ ID NO: 5). Dentro de uma outra forma de realização, o anticorpo é (a) um anticorpo monoclonal de murino, (b) um anticorpo humanizado derivado de (a) ou (c) um fragmento de anticorpo ou (d) um anticorpo monoclonal humano. Dentro de uma outra forma de realização o anticorpo compreende ainda um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, rótulo de peptídeo, partícula magnética ou toxina. Dentro de uma outra forma de realização o anticorpo compreende ainda PEGulação. Dentro de uma outra forma de realização o anticorpo é um anticorpo neutralizante. Dentro de uma outra

forma de realização a administração do anticorpo a um mamífero inibe, previne, reduz ou bloqueia a atividade pró-inflamatória do polipeptídeo. Dentro de uma outra forma de realização a administração do anticorpo a um mamífero inibe, previne, reduz ou bloqueia a coceira e dermatite associadas com a atividade pró-inflamatória do polipeptídeo.

5 Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a
10 American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871; d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; e e) Designação de Depósito de
15 Patente ATCC PTA-6830.

 Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a
20 American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; e c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871.

 Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo
25 monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC

PTA-6829; e b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830.

5 Dentro de um outro aspecto é fornecido um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; e b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875.

10 Dentro de um outro aspecto é fornecido um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6874. Dentro de uma forma de realização o anticorpo é
15 um anticorpo neutralizante. Dentro de uma forma de realização a administração do anticorpo a um mamífero inibe, previne, reduz ou bloqueia a atividade pró-inflamatória do polipeptídeo. Dentro de uma forma de realização a administração do anticorpo a um mamífero inibe, previne, reduz ou bloqueia a coceira e a dermatite associadas com a atividade pró-
20 inflamatória do polipeptídeo.

 Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um método de reduzir a inflamação em um mamífero que compreende administrar ao mamífero uma quantidade dos anticorpos IL-31 aqui descritos, por meio do qual a inflamação é reduzida.

25 Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória em que IL-31 desempenha um papel, que compreende: administrar um antagonista de IL-31 ao mamífero tal que a inflamação é reduzida, em que o antagonista compreende (i) um anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo de

ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo de IL-31RA ou (ii) um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo de IL-31RA; e em que a atividade inflamatória de IL-31 é reduzida. Dentro de uma forma de realização a doença é uma doença inflamatória que compreende doenças pruríticas. Dentro de uma forma de realização a doença é a dermatite atópica. Dentro de uma forma de realização a doença é o prurigo nodular.

Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um método de reduzir, inibir ou prevenir o efeito de prurido em um mamífero em que IL-31 desempenha um papel, que compreende: administrar um antagonista de IL-31 ao mamífero tal que o prurido é reduzido, em que o antagonista compreende (i) um anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo de ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo do polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 ou um fragmento deste; e em que a atividade prurítica de IL-31 é reduzida. Dentro de uma forma de realização a doença do mamífero é a dermatite atópica. Dentro de uma forma de realização a doença do mamífero é dermatite. Dentro de uma forma de realização o anticorpo é um anticorpo como aqui descrito.

Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um método de reduzir, inibir ou prevenir o efeito de prurido em um mamífero em que IL-31 desempenha um papel, que compreende: administrar um antagonista de IL-31 ao mamífero tal que haja uma redução na coceira no mamífero em que o antagonista compreende (i) um anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo de ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo do polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 ou um fragmento deste; e por meio do qual a atividade de coceira de IL-31 é reduzida. Dentro de uma forma de realização a doença do mamífero é a dermatite atópica. Dentro de uma forma de realização

a doença do mamífero é a dermatite. Dentro de uma forma de realização o anticorpo é um anticorpo como aqui descrito.

Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a
5 seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo número de designação de clone de hibridoma selecionado de: a) clone 292.12.3.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815); b) clone 292.63.5.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829); c) clone 292.72.3.1 (Designação de Depósito de
10 Patente ATCC PTA-6816); d) clone 292.84.1.6 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871); e e) clone 292.118.6.4 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830).

Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a
15 seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo número de designação de clone de hibridoma selecionado de: a) clone 294.35.2.6.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872); b) clone 294.144.3.5 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873); c) clone 294.154.5.6 Designação de Depósito
20 de Patente ATCC PTA-6875); e d) clone 294.163.2.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831).

Dentro de um outro aspecto a invenção fornece um anticorpo monoclonal que compreende um anticorpo monoclonal que é capaz de competir quanto a ligação de um polipeptídeo que compreende a seqüência de
25 aminoácido da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; c) Designação de

Depósito de Patente ATCC PTA-6829; d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830; e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831; f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871; g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

Dentro de um outro aspecto é fornecido um hibridoma, em que o hibridoma é depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830; e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831; f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871; g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

Dentro de um outro aspecto a presente invenção fornece um método de produzir um anticorpo a um polipeptídeo de IL-31 que compreende: inocular um animal com um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de: (a) um polipeptídeo que consiste de 9 a 141 aminoácidos, em que o polipeptídeo é idêntico a uma seqüência contígua de resíduos de aminoácido na SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 24 (Ser) ao aminoácido número 164 (Thr); um polipeptídeo como divulgado acima; (c) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 38 a 52; (d) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 83 a 98; (e) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 104 a 117; (f) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 137 a 152; (g) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ

ID NO: 2 do aminoácido número 38 a 152; (h) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 do aminoácido número 24 a 164; (c) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 38 a 52; (d) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 85 a 98; (e) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 104 a 118; (f) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 141 a 157; (g) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 38 a 157; (h) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11 do aminoácido número 24 a 163; (i) um polipeptídeo que compreende um epítipo antigênico de acordo com um perfil de hidrofiliçidade de Hopp/Woods da SEQ ID NO: 2 ou SEQ I NO 11, em que o perfil está fundamentado em uma janela de seis resíduos móveis. Os resíduos G, S e T ocultos e os resíduos H, Y e W expostos ignorados; e em que o polipeptídeo evoca uma resposta imune no animal para produzir o anticorpo; e isolar o anticorpo a partir do animal.

Dentro de um outro aspecto a presente invenção fornece um anticorpo (por exemplo, anticorpo neutralizante) produzido pelo método como divulgado acima, em que o anticorpo se liga a um polipeptídeo da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11. Em uma forma de realização, o anticorpo divulgado acima especificamente se liga a um polipeptídeo mostrado na SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11.

Dentro de um outro aspecto a presente invenção fornece um método de detectar a presença de IL-31 em uma amostra biológica, que compreende as etapas de: (a) contatar a amostra biológica com um anticorpo ou um fragmento de anticorpo como divulgado acima, em que o contatar é realizado sob condições que permitam a ligação do anticorpo ou fragmento de

anticorpo com a amostra biológica e (b) detectar qualquer um do anticorpo ligado ou fragmento de anticorpo ligado.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de matar as células cancerosas que compreende, obter *ex vivo* um tecido ou amostra biológica contendo células cancerosas de um paciente ou identificar células cancerosas *in vivo*; produzindo um polipeptídeo pelo método como aqui divulgado; formulando o polipeptídeo em um veículo farmacêuticamente aceitável; e administrando ao paciente ou expondo as células cancerosas ao polipeptídeo; em que o polipeptídeo mata as células.

Em uma forma de realização o método de matar as células cancerosas é como divulgado acima, em que o polipeptídeo é ainda conjugado a uma toxina. Em uma forma de realização o anticorpo é como divulgado acima, em que o anticorpo é selecionado do grupo que consiste de: (a) anticorpo policlonal, (b) anticorpo monoclonal de murino, (c) anticorpo humanizado derivado de (b), (d) um fragmento de anticorpo e (e) anticorpo monoclonal humano.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um anticorpo ou fragmento de anticorpo que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende uma seqüência de resíduos de aminoácido selecionados do grupo que consiste de: (a) o polipeptídeo mostrado dos resíduos 38 (Val) ao 152 (Leu) como mostrado na SEQ ID NO: 2; (b) o polipeptídeo mostrado dos resíduos 27 (Leu) ao 164 (Thr) como mostrado na SEQ ID NO: 2; (c) o polipeptídeo mostrado dos resíduos 24 (Thr) ao 164 (Thr) como mostrado na SEQ ID NO: 2; e (d) o polipeptídeo mostrado dos resíduos 1 (Met) ao 164 (Thr) como mostrado na SEQ ID NO: 2. Em uma outra forma de realização o anticorpo é como divulgado acima, em que o anticorpo compreende ainda um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, rótulo de peptídeo, partícula magnética, medicamento ou toxina.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um

método para inibir a proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética que compreende cultivar as células da medula óssea ou sangue periférico com uma composição que compreende uma quantidade de um anticorpo como aqui
5 divulgado suficiente para reduzir a proliferação ou diferenciação das células hematopoiéticas nas células da medula óssea ou sangue periférico quando comparado com as células da medula óssea ou sangue periférico cultivadas na ausência de receptor de citocina solúvel. Em uma forma de realização o método para inibir a proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de
10 células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como divulgado acima, em que as células hematopoiéticas e as células progenitoras hematopoiéticas são células linfóides. Em uma outra forma de realização o método para inibir a proliferação ou diferenciação induzidas pela IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como
15 divulgado acima, em que as células linfóides são macrófagos ou células T.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de reduzir a inflamação induzida pela IL-31 que compreende administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de um anticorpo como aqui divulgado suficiente para reduzir a
20 inflamação.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação que compreende: (1) determinar um nível de uma molécula inflamatória; (2) administrar uma composição que compreende um anticorpo
25 como aqui divulgado em um veículo farmacologicamente aceitável; (3) determinar um nível após a administração da molécula inflamatória; (4) comparar o nível da molécula inflamatória na etapa (1) com o nível da molécula inflamatória na etapa (3), em que uma falta de aumento ou uma diminuição do nível de molécula inflamatória é indicativo de supressão de

uma resposta inflamatória. Em uma forma de realização, o anticorpo é como divulgado acima, em que o anticorpo compreende ainda um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, rótulo de peptídeo, partícula magnética, medicamento ou toxina.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para inibir a proliferação ou diferenciação induzidas pela IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética que compreende cultivar células da medula óssea ou sangue periférico com uma composição que compreende uma quantidade de um anticorpo como aqui divulgado suficiente para reduzir a proliferação ou diferenciação das células hematopoiéticas nas células da medula óssea ou sangue periférico quando comparadas com as células da medula óssea ou sangue periférico cultivadas na ausência de receptor de citocina solúvel. Em uma forma de realização o método para inibir a proliferação ou diferenciação induzidas pela IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como divulgado acima, em que as células hematopoiéticas e as células progenitoras hematopoiéticas são células linfóides. Em uma outra forma de realização o método para inibir a proliferação ou diferenciação induzidas pela IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como divulgado acima, em que as células linfóides são macrófagos ou células T.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de reduzir a inflamação induzida pela IL-31 que compreende administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de um anticorpo como aqui divulgado suficiente para reduzir a inflamação.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação que compreende: (1) determinar um nível de uma molécula

inflamatória; (2) administrar uma composição que compreende um anticorpo como aqui divulgado em um veículo farmaceuticamente aceitável; (3) determinar um nível após a administração da molécula inflamatória; (4) comparar o nível da molécula inflamatória na etapa (1) com o nível da molécula inflamatória na etapa (3), em que uma falta de aumento ou uma diminuição no nível de molécula inflamatória é indicativo de suprimir uma resposta inflamatória.

Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória em que IL-31 desempenha um papel, que compreende: administrar um antagonista de IL-31 ao mamífero tal que a inflamação seja reduzida, em que o antagonista é selecionado do grupo que consiste de um anticorpo ou polipeptídeo de ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo de IL-31 (SEQ ID NO: 2). Em uma forma de realização, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como divulgado acima, em que a doença é uma doença inflamatória crônica. Em uma outra forma de realização, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como divulgado acima, em que a doença é uma doença inflamatória crônica selecionada do grupo que consiste de: doença do intestino inflamatório; colite ulcerativa; doença de Crohn; dermatite atópica; eczema; e psoríase. em uma outra forma de realização, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como divulgado acima, em que a doença é uma doença inflamatória aguda. Em uma outra forma de realização, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como divulgado acima, em que a doença é uma doença inflamatória aguda selecionada do grupo que consiste de: endotoxemia; septicemia; síndrome do choque tóxico; e doença infecciosa. Em uma outra forma de realização, o método de tratar um mamífero afligido com

um doença inflamatória é como divulgado acima, em que o anticorpo compreende ainda um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, rótulo de peptídeo, partícula magnética, medicamento ou toxina.

5 Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para detectar a inflamação em um paciente, que compreende: obter um tecido ou amostra biológica de um paciente; incubar o tecido ou amostra biológica com um anticorpo como aqui divulgado sob condições em que o anticorpo se liga ao seu polipeptídeo complementar no tecido ou amostra
10 biológica; visualizar o anticorpo ligado no tecido ou amostra biológica; e comparar os níveis de anticorpo ligado no tecido ou amostra biológica do paciente com um tecido ou amostra biológica de controle normal, em que um aumento no nível de anticorpo ligado ao tecido ou amostra biológica do paciente em relação ao tecido ou amostra biológica de controle normal é
15 indicativo de inflamação no paciente.

 Dentro de um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para detectar a inflamação em um paciente, que compreende: obter um tecido ou amostra biológica de um paciente; rotular um polinucleotídeo que compreende pelo menos 14 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 1 ou
20 o complemento da SEQ ID NO: 1; incubar o tecido ou amostra biológica sob condições em que o polinucleotídeo hibridizará com a seqüência de polinucleotídeo complementar; visualizar o polinucleotídeo rotulado no tecido ou amostra biológica; e comparar o nível de hibridização de polinucleotídeo rotulado no tecido ou amostra biológica do paciente com um tecido ou
25 amostra biológica de controle normal, em que um aumento na hibridização de polinucleotídeo rotulado com o tecido ou amostra biológica do paciente em relação ao tecido ou amostra biológica de controle normal é indicativo de inflamação no paciente.

A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos não

limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Geração de Mabs anti-IL-31 de camundongo de Rato

5 A. imunização e Triagem Sérica de Ratos

Quatro ratos Sprague-Dawley fêmeas de 3 meses de idade (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) foram imunizados com IL-31 de camundongo. Os ratos foram inicialmente imunizados pela injeção intraperitoneal com ~290 µg de IL-31 de camundongo purificada, recombinate (produzidos em células BHK) fundidas no terminal C com um peptídeo que consiste da seqüência EYMPME (SEQ ID NO: 7) (daqui em diante aludido como mIL31-CEE) em combinação com Adjuvante Completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) como pelas instruções do fabricante. A seguir da imunização inicial cada um dos ratos recebeu um adicional de 150 µg de mIL-31-CEE em Adjuvante de Freund Incompleto por intermédio da via intraperitoneal a cada duas semanas em um período de seis semanas. Sete dias depois da terceira e quarta imunizações os ratos foram sangrados por intermédio do plexo retroorbital e o soro separado do sangue para a análise da sua capacidade para ligar ao mIL-31-CEE em solução e para inibir (como medido pela neutralização) a atividade estimulatória de mIL-31-CEE em uma linhagem de célula transfectada com o IL-31 de camundongo RA.

A capacidade dos anticorpos anti-IL-31 de camundongo de rato nos anti-soros para ligar ao mIL-31-CEE foi avaliada usando um ensaio de ELISA no modo de “captura”. Neste ensaio, os reservatórios de placas de ELISA de poliestireno de 96 reservatórios foram primeiro revestidos com 100 µl/reservatório de IgG anti-rato de cabra, anticorpo específico de Fc (Jackson ImmunoResearch) a uma concentração de 500 ng/ml em 0,1 M de Na₂CO₃, pH 9,6. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C depois que anticorpo não ligado foi aspirado e as placas lavadas duas vezes com 300 µl/reservatório de PBS-Tween (0,137 M de NaCl,

0,0027 M de KCl, 0,0072 M de Na₂HPO₄, 0,0015 M de KH₂PO₄, 0,05% v/v de polissorbato 20, pH 7,2). Os reservatórios foram bloqueados com 200 µl/reservatório de SuperBlock (Pierce, Rockford, IL) por 5 minutos na temperatura ambiente (RT), o SuperBlock removido com um peteleco da placa e o bloco repetido uma vez mais
5 depois do que as placas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween. As diluições seriais de 10 vezes (em PBS-Tween mais 1% p/v de albumina sérica bovina (BSA) e 0,05% v/v de Proclin 300, pH 7,2 = tampão de diluição) dos soros foram preparados começando com uma diluição inicial de 1:1000 e variado para 1:1.000.000. Amostras em triplicata de cada diluição foram depois transferidas para a placa de ensaio, 100
10 µl/reservatório, de modo a ligar a IgG de rato nos soros à placa de ensaio através da porção Fc da molécula. Os soros de rato normais serviram como um controle negativo. A seguir de uma incubação de 1 hora na RT, os reservatórios foram aspirados e as placas lavadas duas vezes como descrito acima. mIL-31-CEE biotinilado (razão molar 12:1 de biotina:proteína) a uma concentração de 500 ng/ml
15 foi depois adicionado aos reservatórios, 100 µl/reservatório. A seguir de uma incubação de 1 hora na RT, mIL-31-CEE biotinilado não ligado foi aspirado dos reservatórios e as placas lavadas duas vezes. Estreptavidina rotulada com rábano peroxidase (Pierce, Rockford, IL) a uma concentração de 500 ng/ml foi depois adicionada a cada reservatório, 100 µl/reservatório e as placas incubadas na RT por 1
20 hora. Depois da remoção de HRP-AS não ligado, as placas foram lavadas 5 vezes, 100 µl/reservatório de tetrametil benzidina (T MB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) adicionado a cada reservatório e as placas incubadas por 5 minutos na RT. O desenvolvimento de cor foi interrompido pela adição de 100 µl/reservatório de 450 nm de T MB Stop Reagent (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e os
25 valores de absorbância dos reservatórios lidos em um instrumento Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

A capacidade dos anticorpos anti-IL-31 de camundongo de rato nos anti-soros para inibir (como medido pela neutralização) a atividade estimulatória de IL-31 de camundongo através do seu receptor cognato foi

avaliado usando um ensaio de neutralização com base em célula que utilizou uma linhagem de célula Baf3 transfectada com mIL-31RA/OS MRbeta com um sistema repórter de luciferase (Baf3/KZ134/mcytor17/mOS MRbeta) e pôde ser ativada por intermédio de estimulação das células pela IL-31 de camundongo. Para este ensaio, uma diluição 1:250 inicial em meio de ensaio (RP MI 1640, 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1X penicilina-estreptomicina-neomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA)) de cada anti-soro foi preparado e depois que cada um destes foi diluído em série de 2 vezes a uma diluição final de 1:32000. A cada diluição de anti-soros foi adicionado um volume igual de mIL-31-CEE diluído a 4 ng/ml em tampão de ensaio para um volume total de 100 µl nos reservatórios. As misturas de anticorpo/citocina foram incubadas na RT por 0,5 hora depois que as células alvo foram lavadas do seu meio de cultivo, ajustadas a uma densidade de 300.000 células/ml e adicionadas às misturas de anticorpo/citocina, 100 µl/reservatório. Os meios de ensaio contendo 2 ng/ml de mIL-31 e nenhum anti-soro serviu como um controle negativo e indicou a estimulação máxima que pôde ser obtida no ensaio. A seguir da incubação a 37°C, 5% de CO₂ por 16 a 24 horas as placas foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, os meios cuidadosamente removidos com um peteleco e 25 µl de 1x tampão de lise de célula (Promega, Madison, WI) adicionado a cada reservatório. As placas foram suavemente agitadas por 10 minutos na RT para permitir a lise de célula completa e depois os lisados de célula foram transferidos para placas de placas de 96-reservatórios brancas sólidas (Corning/Costar 3917, Acton, MA). 40 µl de substrato de ensaio de luciferase (Promega) foram adicionados a cada reservatório. Os reservatórios foram depois avaliados quanto a atividade de luciferase (representando a ativação de IL-31 da construção repórter STAT) em um luminômetro usando um intervalo de integração de 5 segundos.

Tanto o ensaio de ELISA de “captura” assim como o ensaio de

neutralização com base em célula indicaram que todos os quatro ratos desenvolveram uma resposta de anticorpo significativa ao mIL-31 embora um rato claramente gerou uma resposta mais forte do que os outros. No geral, a resposta como medida pelo ELISA de “captura” quase emparelhou com aquela observada com o ensaio de neutralização com base em célula sugerindo que o anticorpo de classe IgG foi primariamente responsável pela inibição de mIL-31.

B. Fusão

Quatro semanas depois da última imunização intraperitoneal, o rato com o título de neutralização de mIL-31 mais significativo foi imunizado uma vez final com aproximadamente 150 µg de mIL-31-CEE em PBS por intermédio da injeção intravascular. Cinco dias mais tarde, o baço e linfonodos deste rato foram colhidos, preparados em uma única suspensão de célula e fundidos à linhagem de célula de mieloma de camundongo Sp2/0 (Shulman, M. *et al.*, Nature 276: 269-270, 1976) em uma razão de célula linfóide:célula de mieloma de 4:1 com PEG 1500 usando métodos padrão conhecidos na técnica (Harlow, E. e Lane, D. 1988. “Antibodies A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). A mistura de fusão foi distribuída em uma série de placas de fundo chato de 96 reservatórios em combinação com timócitos de BALB/c como uma camada alimentadora (Oi, V. T. e Herzenberg, L. A. 1980. “Selected Methods in Cellular Immunology”, B. B. Mishell e S. M. Shiigi, eds., pp. 351-372, Freeman, San Francisco). Os reservatórios das placas de fusão foram alimentadas uma vez com uma substituição de 70% de meio e timócitos depois de 4 dias e mais uma vez dois dias mais tarde apenas com meio. Os reservatórios foram ensaiados oito dias depois do plaqueamento da fusão.

C. Triagem da Fusão

O ELISA de “captura” para mIL-31 como descrito acima foi usado como a triagem primária exceto que os sobrenadantes de hibridoma

foram testados não diluídos e foram plaqueados duplicados em placas de ensaio das placas de cultura. Aproximadamente 170 reservatórios positivos foram identificados. Os sobrenadantes de cada um destes reservatórios assim como uns poucos reservatórios negativos foram depois avaliados quanto a sua capacidade para inibir mIL-31 no ensaio de neutralização com base em célula descrito mais no princípio. Cada um foi testado a uma diluição final de 1:8 em meio de ensaio. Na última diluição, componentes estimulatórios não específicos nos sobrenadantes de hibridoma foram suficientemente reduzidos tal que fossem de contribuição mínima para o índice de estimulação observado. A maioria dos sobrenadantes pareceram neutralizar mIL-31 em algum grau com aproximadamente dez deles demonstrando neutralização essencialmente completa e o resto mostrando uma seqüência contínua de inibição até um ponto onde aproximadamente outros dez pareceram possuir muito pouca se alguma neutralização potencial. As células de hibridoma em aproximadamente 150 dos reservatórios positivos de ELISA de “captura” foram expandidos com sucesso em cultura em placas de 24 reservatórios. Quando a densidade das culturas em 24 reservatórios foi de aproximadamente 4 a 6×10^5 células/ml, o sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) foi individualmente coletado e armazenado para cada reservatório e as células de cada reservatório crioconservadas.

Cada um dos sobrenadantes dos 24 reservatórios foi reanalisado tanto no ELISA de “captura” quanto nos ensaios de neutralização de IL-31 com base em célula utilizado na triagem de fusão. Além disso, estes sobrenadantes também foram testados em um ELISA de “captura” utilizando o homólogo humano de IL-31 também construído com o rótulo EYMPME (SEQ ID NO: 7) fundido ao terminal C da molécula de IL-31 e produzido em células BHK. Os resultados indicaram que a seguir da expansão, uma maioria dos sobrenadantes do reservatório mestre retiveram a sua capacidade para reconhecer IL-31 de camundongo em solução. Entre estes reservatórios

positivos de ensaio de “captura”, a atividade inibitória de mIL-31 variou de completa a quase completa para cerca de 20 sobrenadantes até essencialmente nenhuma inibição para 10 a 15 sobrenadantes. Nenhuma reatividade cruzada para a IL-31 humana-CEE foi observada no ensaio de captura indicando que

5 nenhum dos anticorpos anti-mIL-31 de rato reagiram cruzado com o homólogo IL31 humano ou reconheceu o rótulo CEE fundido ao terminal C da molécula de mIL-31-CEE.

D. Seleção e Clonagem de Hibridomas que Produzem a Neutralização de Mabs Anti-mIL31

10 As células em sete dos dez reservatórios mestres de neutralização de IL-31 (271.5.7, 271.9.4, 271.26.6, 271.27.4, 271.33.1, 271.33.3 e 271.39.4) foram clonados de modo a isolar um hibridoma clonado que produz o mAb neutralizante de interesse. As células foram clonadas na presença de timócitos em placas de cultura de célula de microtítulo de 96

15 reservatórios usando um método de diluição de baixa densidade padrão (menos do que 1 célula por reservatório) e a monoclonalidade foi avaliada pela examination em microscópio de reservatórios para um único foco de crescimento antes do ensaio. Seis dias após o plaqueamento, todos os reservatórios nas placas foram triados pelo ELISA de “captura” quanto ao

20 IgG específico de mIL-31. O sobrenadante de 6 a 10 reservatórios que foi mAb tanto positivo quanto específico e originado de reservatórios com apenas uma única colônia de hibridoma cultivada foi coletado de cada conjunto de clonagem e retriado em várias diluições no ELISA de “captura” assim como

25 no ensaio de neutralização com base em célula para identificar um clone que produz mAb neutralizante “melhor”. Os resultados destes testes indicaram que os clones de hibridoma que produzem mAb neutralizante apropriado foram obtidos apenas nos conjuntos 271.9.4, 271.26.6, 271.33.1, 271.33.3 e 271.39.4. Um clone do “melhor” em cada um destes conjunto foi reclonado e os subclones triados como descrito para produzir as linhagens de hibridoma

5 finais 271.9.4.2.6, 271.26.6.6.1, 271.33.1.2.2, 271.33.3.2.1 e 271.39.4.6.5. O isótipo de IgG de rato do mAb produzido por cada um destes hibridomas foi determinado usando um ELISA que utilizou mAbs específico de isótipo IgG anti-camundongo de rato biotinilado. Todos os cinco mAbs foram descobertos pertencer à subclasse IgG1. O hibridoma 271.26.6.6.1 foi depositado com o depósito de patente da American Type Tissue Collection (ATCC, Manassas, VA) como um depósito original sob o Tratado de Budapeste dado o Acesso ATCC No. PTA-6874.

10 Cada mAb anti-IL-31 de camundongo totalmente clonado que produz hibridomas foi adaptado ao cultivo em meio isento de soro de hibridoma (hibridoma-SFM, Invitrogen). O sobrenadante de culturas de alta densidade de célula cultivada em hibridoma-SFM foi centrifugado para remover as células e fragmentos celulares, filtrados através de um filtro de 0,2 µm e o mAb purificado pela cromatografia de proteína G usando métodos
15 padrão conhecidos na técnica.

E. Classificação da Atividade de Neutralização Específica *In Vitro* de MAbs

Para classificar a atividade de neutralização específica *in vitro* de cada um dos cinco mAbs anti-IL-31 de camundongo de rato, cada um dos mAbs purificados foi retestado no ensaio de neutralização com base em célula
20 descrito mais no princípio com a exceção de que mIL-31 foi primeiro adicionado às células e esta mistura depois adicionada aos anticorpos. Além de neutralizar a atividade contra mIL-31-CEE, os mAbs também foram avaliados contra uma outra forma de IL-31 de camundongo, chamada de c108smIL-31, em que o resíduo de cisteína na posição 108 foi convertida a
25 um resíduo de serina. O último material foi produzido na *E. coli* sem o peptídeo C-EE. Ambas as formas de mIL-31 foram utilizadas em uma concentração final de 1 e 5 ng/ml. Os mAbs foram ajustados a uma concentração de 20 µg/ml em meio de ensaio e testado em duplicata como diluições em série de 10 vezes variando de 10 µg/ml a 0,00001 µg/ml de

concentração final na mistura de ensaio. Os valores IC₅₀ foram determinados usando o software Softmax (Molecular Devices). Os resultados são mostrados na Tabela 1 e mostram que os mAbs 271.26.6.6.1, 271.33.1.2.2 e 271.39.4.6.5 foram os mAbs neutralizadores mais potentes e foram de potência similar neste teste *in vitro*. De modo interessante, o mAb 271.33.3.2.1 foi muito menos eficaz do que os outros mAbs contra a versão c108smIL-31 de mIL-31 sustentando a conclusão dos estudos de compartimentação de epítipo de que este anticorpo em todas as probabilidades tem uma especificidade de epítipo diferente do que os outros quatro mAbs. O fato que este mAb foi também muito menos eficaz contra a versão mIL-31-CEE sugere que o epítipo reconhecido pelo 271.33.3.2.1 pode envolver parcialmente um sítio de glicosilação na molécula IL-31.

Tabela 1: Atividade de Neutralização Com Base em Célula *In Vitro* de MAbs Anti-IL-31 de camundongo de Rato

mIL-31 versão	Conc. (ng/ml)	IC ₅₀ (ng/ml) para mAbs				
		271.9.4.2.6	271.26.6.6.1	271.33.1.2.2	271.33.3.2.1	271.39.4.6.5
mIL31-CEE	1	11	3	2	13	2
	5	30	14	13	36	12
c108smIL31	1	96	11	7	1248	9
	5	190	43	33	2551	40

Exemplo 2

Geração de mAbs Anti-IL-31 Humana de Camundongo

A. Imunização e Triagem Sérica de Camundongos

Dois grupos de camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade, cinco animais de cada, foram imunizados com IL-31 humana. Os camundongos no Grupo 1 foram imunizados pela injeção intraperitoneal de IL-31 humana purificada, recombinante fundida ao terminal C com um peptídeo que consiste da sequência EYMPME (SEQ ID NO: 7) (daqui em diante aludido como IL-31-CEE) em combinação com adjuvante de

Ribi como pelas instruções do fabricante. Esta proteína foi produzida em células BHK. Os camundongos no Grupo 2 foram similarmente imunizados com uma forma purificada, recombinante, mutada de IL-31 humana em que o resíduo de cisteína na posição 108 foi convertido a um resíduo de serina (daqui em diante aludido como c108sIL-31). Este material foi produzido na *E. coli* sem o peptídeo C-EE. Todos os camundongos receberam 50 µg de proteína a cada duas semanas por um período de 10 semanas. Sete a dez dias depois da terceira e quarta imunizações os camundongos foram sangrados por intermédio do plexo retroorbital e o soro separado do sangue para a análise da sua capacidade para inibir a ligação e atividade estimulatória subsequente de IL-31 humana a uma linhagem de célula transfectada com a IL-RA humana.

A capacidade dos anti-soros individuais para inibir a IL-31 humana foi avaliada usando um ensaio de neutralização com base em luciferase utilizando IL-31-CEE ou c108sIL-31 e células BaF3/KZ134/IL-31RA/OS MRbeta (ver Exemplos 3 e 4) com as seguintes modificações. Os anti-soros individuais foram titulados em duplicata, por intermédio de diluições em série de 4 vezes em uma placa de 96 reservatórios, fundo chato, de poliestireno branco (Corning/Costar 3917) partindo com uma diluição de 1:250 inicial dos anti-soros em tampão de ensaio (RPMI 1640, 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina). Em uma tentativa para normalizar o efeito um tanto estimulador do soro de camundongo neste ensaio, todas as diluições exceto a diluição 1:250 inicial foram realizadas em tampão de ensaio mais 0,2% de soro de camundongo BALB/c normal. O volume de anti-soros diluídos em cada reservatório foi de 100 µl. As células foram lavadas 1,5 vez em tampão de ensaio, ajustado a uma concentração de 3×10^6 /ml, combinadas com IL-31-CEE (100 pg/ml) ou c108sIL-31 (30 pg/ml) e a mistura depois adicionada às placas, 100 µl/reservatório. O volume de ensaio total foi de 200 µl/reservatório que consiste de 30.000 células, IL-

31 em uma concentração final de 50 pg/ml (IL-31-CEE) ou 15 pg/ml (c108sIL-31) e anti-soros a uma diluição final de 1:500, 1:2000, 1:8000, 1:32000, 1:128000, 1:512000, 1:2048000 e 1:8192000. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 16 a 24 horas depois do que foram centrifugadas a 1250 RPM por 5 minutos, o meio cuidadosamente removido com um peteleco e 25 µl de 1x tampão de lise de célula adicionado a cada reservatório. As placas foram suavemente agitadas por 10 minutos para permitir a lise de célula depois que 40 µl de substrato de ensaio de luciferase fosse adicionado a cada reservatório. Os reservatórios foram depois avaliados quanto a atividade de luciferase (representando a ativação pelo IL-31 da construção repórter STAT) em um luminômetro usando um intervalo de integração de 4 segundos.

No geral os anti-soros de camundongos imunizados com IL-31-CEE foram descobertos inibir eficazmente a atividade estimulatória tanto de IL-31-CEE quanto de c108sIL-31 e vice e versa, neste ensaio. Por esta razão, mais ensaios de neutralização foram usualmente realizados apenas com IL-31-CEE.

Aqueles camundongos com os títulos de neutralização mais forte foram usados para uma série de três fusões com o objetivo de gerar anticorpos monoclonais que produzem hibridomas que podem neutralizar muito eficazmente a interação de IL-31 com seu receptor cognato.

B. Fusões

Fusão 291

A primeira fusão utilizou células de linfonodo de um camundongo imunizado com IL-31-CEE e um camundongo imunizado com c108sIL-31. Cada um destes animais foi imunizado por uma sexta vez com 15 µg do respectivo imunógeno diluído em PBS e administrado por intermédio de injeção intravascular três semanas depois da sua última imunização. Três dias mais tarde, o baço e os linfonodos destes camundongos foram colhidos,

combinados, processados em uma única suspensão de célula (total de $4,69 \times 10^8$ células) e depois fundidos a um clone da linhagem de célula de mieloma de camundongo P3-X63-Ag8.653 (Kearney, J. F. *et al.*, J Immunol. 123: 1548-50, 1979) (designado P3-X63-Ag8.653.3.12.11) a uma razão de 2,3:1 de célula linfóide:célula de mieloma com 3 ml de PEG 1500 por 2 minutos e 55 segundos usando métodos padrão conhecidos na técnica (Lane, R. D. J Immunol Methods 81: 223-8, 1985). A mistura de fusão foi distribuída em uma série de placas de fundo redondo de 96 reservatórios, alimentadas uma vez com uma substituição de 70% do meio depois de 4 dias e ensaiadas 6 dias mais tarde.

Fusão 292

A segunda fusão utilizou células linfóides de um camundongo imunizado com IL-31-CEE. Além das cinco imunizações intraperitoneais mencionadas acima, este camundongo recebeu uma injeção intravascular de 15 μ g de IL-31-CEE em PBS três semanas depois da última injeção intraperitoneal e uma injeção similar três semanas depois da primeira imunização intravascular. Três dias mais tarde, o baço e linfonodos foram processados (total de $2,27 \times 10^8$ células) e fundidos a P3-X63-Ag8.653.3.12.11 em uma razão 2:1 de célula linfóide:célula de mieloma com 1,8 ml de PEG 1500 por 2 minutos e 55 segundos como descrito acima. A mistura de fusão foi distribuída em uma série de placas de fundo chato de 96 reservatórios, alimentadas uma vez com uma substituição de 70% de meio depois de 4 dias e ensaiadas 5 dias mais tarde.

Fusão 294

A última fusão utilizou células linfóides de um camundongo imunizado apenas com c108sIL-31. Além das cinco imunizações intraperitoneais com este antígeno descrito mais no princípio, este camundongo recebeu uma injeção intravascular de 15 μ g de c108sIL-31 em PBS seis semanas depois da última injeção intraperitoneal e depois mais uma

vez duas semanas depois da primeira injeção intravascular. Três dias mais tarde, o baço e linfonodos foram processados (total de $1,586 \times 10^8$ células) e fundido a P3-X63-Ag8.653.3.12.11 a uma razão de 2:1 de célula linfóide:célula de mieloma com 1,5 ml de PEG 1500 por 2 minutos e 55 segundos como descrito acima. A mistura de fusão foi distribuída em uma série de placas de 96 reservatórios de fundo chato, alimentadas duas vezes com uma substituição de 70% de meio depois de 4 e 6 dias e ensaiados 3 dias depois da última alimentação.

C. Triagem de Fusões

Todas as três fusões foram triadas usando o ensaio de neutralização de IL-31 com base em célula descrito acima com duas modificações. Primeiro, ao invés de anti-soros diluídos nas placas de ensaio, 100 µl de sobrenadante de cada um dos reservatórios nas placas de fusão foram plaqueados em duplicata nas placas de ensaio. Segundo, a concentração final de IL-31-CEE na mistura de ensaio foi de 150 pg/ml.

Além do ensaio de neutralização, diversas placas de cada fusão, escolhidas aleatoriamente, foram triadas quanto aos anticorpos IgG que podem ligar a IL-31-CEE que foram previamente adsorvidos em placas ELISA de polistireno. O propósito deste ensaio foi identificar reservatórios mestre contendo um hibridoma que produza um anticorpo anti-IL31 que neutralizou IL-31 de modo deficiente ou falhou completamente em neutralizar esta citocina. Neste ensaio, os reservatórios de placas de ELISA de poliestireno de 96 reservatórios foram inicialmente revestidos com 50 µl/reservatório de IL31-CEE a uma concentração de 200 ng/ml em 0,1 M de Na_2CO_3 , pH 9,6. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C depois que o antígeno não ligado foi aspirado e as placas lavadas duas vezes com 300 µl/reservatório de PBS-Tween (0,137 M de NaCl, 0,0027 M de KCl, 0,0072 M de Na_2HPO_4 , 0,0015 M de KH_2PO_4 , 0,05% v/v de polissorbato 20, pH 7,2). Os reservatórios foram bloqueados com 200 µl/reservatório de PBS-

Tween + 1% de BSA por 1 hora na temperatura ambiente (RT). A solução de bloqueio foi depois removida com um peteleco das placas e 50 µl de meio condicionado de cada reservatório das placas de fusão plaqueadas em duplicata nos reservatórios da placa de ensaio. As placas foram incubadas por 5 1 hora na RT depois do que o anticorpo não ligado foi aspirado e as placas lavadas duas vezes com 300 µl/reservatório de PBS-Tween. IgG anti-camundongo de cabra conjugado a HRP, os anti-soros específicos de Fc (Jackson Immuno-research) foram diluídos a 1:5000 em PBS-Tween + 1% de BSA e adicionado aos reservatórios das placas de ensaio, 100 µl/reservatório. 10 A seguir de uma incubação de 1 hora na RT, o anticorpo da segunda etapa não ligado foi aspirado dos reservatórios e as placas lavadas 5 vezes. 100 µl/reservatório de tetrametil benzidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) foram depois adicionados a cada reservatório e as placas incubadas por 5 minutos na RT. O desenvolvimento de cor foi interrompido 15 pela adição de 100 µl/reservatório de 450 nm de TMB Stop Reagent (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e os valores de absorbância dos reservatórios lidos em um instrumento Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

Os resultados dos ensaios de neutralização mostrou que 52 e 20 139 reservatórios nas Fusões 291 e 292, respectivamente, contiveram um anticorpo que inibiu pelo menos 40% da atividade estimulatória de IL-31. Uma definição mais rigorosa de positividade foi aplicada à fusão 294 onde foi observado que 131 reservatórios contiveram um anticorpo que inibiu pelo menos 70% da atividade de IL-31. Os resultados de ensaios de ELISA para 25 detectar mAbs que se ligam a IL-31-CEE indicaram que em uma maioria de casos, se um reservatório mestre foi descoberto conter um anticorpo IgG que se liga a IL-31-CEE, este também conteve um anticorpo que inibiu IL-31-CEE no ensaio de neutralização com base em célula. Houve alguns reservatórios, entretanto, que foram positivos no ensaio de ELISA mas que

mostrou capacidade inibitória relativamente fraca no ensaio de neutralização com base em célula e estes foram salvos para análise posterior como descrito abaixo.

As células de hibridoma que crescem nos reservatórios mestre positivos foram expandidos em cultura em placas de 24 reservatórios. Quando a densidade das culturas de 24 reservatórios foi aproximadamente $4 \text{ a } 6 \times 10^5$ células/ml, o sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) foi individualmente coletado e armazenado para cada reservatório e as células de cada reservatório crioconservadas.

10 D. Seleção e Clonagem de Reservatórios Mestre para Isolar Hibridomas que Produzem Mabs Neutralizantes de IL-31 Potentes

Cada um dos novos sobrenadantes de 24 reservatórios foi reanalisado quanto a capacidade de neutralização de IL-31 usando o ensaio de neutralização de IL-31 com base em célula utilizado na triagem de fusão.

15 Cada sobrenadante foi conduzido não diluído e em duplicata. Os resultados indicaram que a seguir da expansão, uma maioria dos sobrenadantes de reservatório mestre tiveram a atividade inibitória retida igual ou melhor do que aquele observado na triagem mestre original. Para melhor determinar qual dos novos sobrenadantes de reservatório mestre possuíam a capacidade
20 inibitória mais forte, aqueles sobrenadantes que demonstraram aproximadamente 90% ou melhor de inibição de IL-31-CEE neste ensaio foram reanalisados testando-se as diluições do sobrenadante no ensaio de neutralização com base em célula. Os sobrenadantes foram titulados por intermédio de diluições em 3 vezes seriais em meio de fusão nas placas de
25 ensaio para produzir 100 µl em cada reservatório das seguintes diluições: puro, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 e 1:243 e o ensaio realizado como descrito acima para a triagem de fusão. Embora este ensaio claramente identificasse os sobrenadantes mais inibidores, o mesmo foi incapaz de determinar aqueles que tiveram a atividade específica mais alta porque a concentração de

anticorpo anti-IL31 nos sobrenadantes foi desconhecida.

Para tratar o problema da concentração de anticorpo específico, cada um dos sobrenadantes foi testado no formato de titulação, usando as diluições de 2 vezes ou 4 vezes seriais, no IL-31-CEE no ensaio de ELISA direto descrito acima. Depois de plotar os dados no Microsoft EXCEL, a diluição de sobrenadante que produz metade da densidade ótica máxima (OD) observada no ensaio foi determinada que por sua vez forneceu alguma indicação da concentração relativa de anticorpo anti-IL-31 no sobrenadante.

Combinando-se os dados do ensaio de neutralização com aquele do ensaio de ELISA, uma atividade específica relativa foi estabelecida para cada sobrenadante e os vinte reservatórios mestre contendo a atividade específica de neutralização anti-IL-31 mais alta identificada. De maneira interessante, todos os reservatórios mestre neutralizadores anti-IL-31 mais potentes foram derivados da fusão 292. Foi observado nos dados de neutralização para estes reservatórios mestre que embora a inibição de IL-31 máxima fosse obtida para cada sobrenadante no puro e diluição 1:3, o grau absoluto de neutralização foi levemente maior para alguns sobrenadantes do que outros como refletido em contagens de unidade de luciferase relativa levemente mais baixas. Isto foi interpretado como graus levemente diferentes de neutralização de IL-31 “completa”. Ligando-se esta observação com a atividade específica de neutralização relativa para cada reservatório mestre, a lista dos vinte reservatórios mestre neutralizantes mais potentes foi reduzida aos dez melhores aparentes. Estes incluíram 292,12, 292,39, 292,51, 292,63, 292,64, 292,72, 292,84, 292,105, 292,109 e 292,118.

As células em cada um destes dez mais reservatórios mestre de IL-31 neutralizantes foram clonados de modo a isolar um hibridoma clonado que produz o mAb neutralizante de interesse. As células foram clonadas em placas de cultura de célula de microtítulo de 96 reservatórios usando um

método de diluição de densidade baixa padrão (menos do que 1 célula por reservatório) e a monoclonalidade foi avaliada pela examinação microscópica de reservatórios para um foco único de crescimento antes do ensaio. O meio de clonagem consistiu de meio de fusão que carece do componente HAT (IMDM, 10% de soro FC1, 2mM de L-glutamina, 1X penicilina/estreptomicina, 10% de fator de clonagem de hibridoma (Roche Applied Science). Seis a oito dias após o plaqueamento, os sobrenadantes em todos os reservatórios foram triados pelo ELISA em IL-31-CEE ligado à placa. As células de 4 a 6 reservatórios em cada conjunto em que o sobrenadante foi fortemente positivo para o mAb específico e pareceu ser apenas uma colônia única de hibridoma cultivada foram expandidas em culturas de 24 reservatórios e os sobrenadantes resultantes retestados pelo ELISA em IL-31-CEE ligado à placa e pelo ensaio de neutralização de IL-31 com base em célula. Com base nestes resultados o clone neutralizador mais potente evidente em cada conjunto foi reclonado e triado pelo ELISA como descrito acima. Se 95% ou mais dos reservatórios positivos em crescimento também foram positivos para o mAb específico, outros esforços de subclonagem foram julgados desnecessários e os hibridomas declarados clonais. Apenas para um reservatório mestre, 292,64, houve uma segunda rodada de subclonagem necessária para se obter a percentagem desejada de positividade de mAb específico entre os clones resultantes. As células de 5 a 6 reservatórios em cada conjunto de subclone final em que o sobrenadante foi fortemente positivo para o mAb específico e pareceu haver apenas uma única colônia de hibridoma cultivada foram expandidas em culturas de 24 reservatórios. Cada um dos clones de hibridoma foi depois adaptado para crescer em meio carecendo de fator de clonagem de hibridoma (IMDM, 10% de soro FC1, 2 mM de L-glutamina, 1X penicilina/estreptomicina) dividindo-se as células no último meio quando a densidade de célula foi apropriada. A seguir da adaptação, o sobrenadante foi coletado a partir dos subclones em

cada conjunto e triado pelo ELISA na IL-31-CEE ligada à placa. Com base no título com respeito à densidade de célula no momento da coleta do sobrenadante, um clone final “melhor” foi escolhido levando à seleção do seguinte grupo de clones finais: 292.12.3.1, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 5 292.63.5.3, 292.64.6.5.5, 292.72.3.1, 292.84.1.6, 292.105.4.1, 292.109.4.4 e 292.118.6.4.

O isotipo IgG de camundongo do mAb produzido por cada um destes hibridomas foi determinado usando o teste IsoStrip de Anticorpo Monoclonal de Camundongo (Roche Applied Science). Todos os mAbs foram 10 descobertos pertencer à subclasse IgG1 exceto por 292.72.3.1 e 292.84.1.6 que foram mostrados pertencer à subclasse de IgG2a.

E. Classificação da Atividade de Neutralização Específica *In Vitro* de Mabs Neutralizadores de IL-31 Potentes

Para classificar a atividade neutralizadora específica *in vitro* 15 dos dez mAbs anti-IL-31 de camundongo humana potente, o sobrenadante exaurido de cada um dos clones da primeira rodada foi retestado no ensaio de neutralização com base em célula descrito mais no princípio. Primeiro, a quantidade de IgG em cada sobrenadante foi determinado pela análise de HPLC em uma coluna de proteína G usando um mAb de concentração 20 conhecida como um padrão. Cada sobrenadante foi depois diluído a uma concentração de IgG de 1 µg/ml no mesmo meio usado para gerar o sobrenadante exaurido. Os sobrenadantes diluídos foram depois titulados por intermédio da diluição em serial de 10 vezes em meio para produzir uma faixa de concentração de 1 µg/ml a 0,0001 µg/ml e testado em triplicata no ensaio 25 de neutralização com base em célula previamente descrito com a concentração final de IL-31-CEE ajustado a 300 pg/ml (18,27 pM). Os resultados do ensaio são mostrados na Tabela 2 com os mAbs listados na ordem do mais potente ao menos potente. MAb 292.84.1 e 292.12.3 foram os neutralizadores mais potentes seguidos por sua vez pelos mAbs 292.72.3 e

292.63.5 que pareceram ser aproximadamente metade tão potentes quanto os dois primeiros. O resto dos mAbs mostraram ser aproximadamente 6 a 9 vezes menos potentes do que os dois melhores mAbs.

Tabela 2. Classificação dos MAb's Neutralizantes Anti-IL31 Potentes pela Atividade de Neutralização Específica *In Vitro*

MAb	IC ₅₀ (ng/ml)	IC ₅₀ (p M de)*
292.84.1	1,077 ± 0,021	7,18 ± 0,14
292.12.3	1,197 ± 0,044	7,98 ± 0,29
292.72.3	1,997 ± 0,027	13,31 ± 0,18
292.63.5	2,819 ± 0,034	18,79 ± 0,23
292.51.5	6,478 ± 0,130	43,19 ± 0,87
292.118.6	6,550 ± 0,154	43,67 ± 1,03
292.109.4	8,286 ± 0,151	55,24 ± 1,01
292.39.5	8,633 ± 0,481	57,55 ± 3,20
292.105.4	9,144 ± 0,281	60,96 ± 1,87
292.64.6	10,05 ± 0,295	67,00 ± 1,97

* usando um peso molecular de anticorpo = 150.000 daltons

Com base nos resultados acima, os hibridomas 292.84.1.6, 292.12.3.1, 292.72.3.1, 292.63.5.3 e 292.118.6.4 foram escolhidos como representativos dos diferentes níveis de capacidade de neutralização específica para serem depositados com o depósito de patente da American Type Tissue Collection (ATCC, Manassas, VA) como um depósito original sob o Tratado de Budapeste e foram concedidos os seguintes Acesso ATCC N^{os}: clone 292.12.3.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815), clone 292.72.3.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816), clone 292.63.5.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829), clone 292.118.6.4 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830), e clone 292.84.1.6 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871).

F. Seleção e Clonagem de Reservatórios mestre para Isolar Hibridomas Que Produzem Mabs Neutralizadores de IL-31 Deficientes

De interesse na geração de mAbs anti-IL-31 humanos foi a isolamento de pares de mAbs que poderiam ser usados em um formato de ensaio

intercalado para quantificar a quantidade de IL-31 em fluidos diferentes. Tais pares de mAbs tipicamente têm especificidade quanto a epítomos diferentes na molécula alvo e preferivelmente não competem cruzado quanto a ligação àquela molécula. Para isolar pares candidatos de tais mAbs, uma estratégia foi escolhida para formar par com um excelente mAb neutralizador de IL-31 com um que possua pouco se algum potencial de neutralização, assumindo que dois de tais anticorpos funcionais diferentes estão com certeza ligados a epítomos não sobrepostos (espacialmente separados).

Como mencionado mais no princípio para as triagens de fusão, diversas placas de cada fusão foram triadas pelo ELISA no IL-31-CEE ligado à placa para identificar sobrenadantes de reservatório mestre positivos em anticorpo anti-IL-31. A comparação dos resultados de ELISA com aqueles do ensaio de neutralização com base em célula indicaram a presença de reservatório mestre que continham anticorpo que se ligam bem ao IL-31-CEE mas não neutralizam esta molécula muito bem no ensaio de neutralização com base em célula. Como foi feito com o reservatório mestre neutralizador mais potente, as células de hibridoma que crescem nestes reservatórios mestre foram expandidas em cultura em placas de 24 reservatórios. Quando a densidade das culturas de 24 reservatórios foi de aproximadamente $4 \text{ a } 6 \times 10^5$ células/ml, o sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) foi individualmente coletado e armazenado para cada reservatório e as células de cada reservatório criopreservadas.

Estes novos sobrenadantes foram testados usando o ensaio de neutralização com base em célula (diluições 3 vezes em série começando com sobrenadante puro e prosseguindo até uma diluição de 1:243 final) assim como um ensaio de ELISA no modo de “captura” similar àquele usado no desenvolvimento do mAbs anti-IL-31 de murino de rato com as seguintes diferenças; 1) IgG anti-camundongo de ovelha, anticorpo específico de Fc (Jackson ImmunoResearch) ($1 \mu\text{g/ml}$) como anticorpo de revestimento de

placa, 2) placas bloqueadas uma vez com PBS-Tween + 1% BSA por 1 hora, 3) uma única titulação de cada sobrenadante adicionado aos reservatórios (diluições de 3 vezes em série começando com sobrenadante puro e prosseguindo até uma diluição de 1:2187 final) e 4) adição de IL-31-CEE biotinizado (razão molar de 3:1 de biotina:proteína), 200 ng/ml. Este ensaio foi sentido ser mais pertinente do que a ligação de anticorpo ao IL-31-CEE ligado á placa visto que o mesmo avaliou a capacidade do anticorpo para ligar-se ao IL-31-CEE em solução, uma propriedade essencial para um bom anticorpo para os elisas no modo intercalado. Foi de fato observado que vários dos sobrenadantes de reservatório mestre contendo anticorpo que ligou bem ao IL-31-CEE ligado à placa deficientemente reconheceu esta molécula em solução.

Para escolher quais reservatórios clonar, os hibridomas que secretam anticorpo apropriados de 10 reservatórios foram identificados (291.78, 292.152, 292.154, 294.35, 294.144, 294.146, 294.154, 294.155, 294.158 e 294.163) cujo sobrenadante deficientemente neutralizou IL-31-CEE no ensaio de neutralização (menos do que 50% mais preferivelmente apenas de 1 a 20%) e também ligou relativamente bem ao IL-31-CEE em solução (como observado por uma OD de mais do que 2,0 na concentração pura de sobrenadante). A clonagem, triagem de clones e seleção de um melhor clone da primeira rodada foram realizadas como descrito acima para os reservatórios neutralizador potente.

Para reduzir o número de hibridomas realizando outra subclonagem, dois novos ensaios foram realizados com sobrenadante exaurido de cada um dos clones selecionados da primeira rodada. A primeira avaliação foi uma tentativa para agrupar os mAbs com base na especificidade de epítopo (“compartimentação”) usando o instrumento de ressonância de plasma de superfície Biacore 3000. Um dos bons sobrenadantes de mAb neutralizantes (292.64.6) e os 10 sobrenadantes de clone da primeira rodada

de neutralização mais deficientes foram conduzidos um contra o outro e resultou na identificação de quatro “compartimentos” evidentes. O Compartimento 1 consistiu apenas do anticorpo neutralizante bom. O Compartimento 2 foi compreendido de 292.152.4, 292.154.4, 294 35.2, 294.146.5 e 294.154.5. O Compartimento 3 incluiu 291.78.4, 294.155.6, 294.158.5 e 294.163.2. O Compartimento 4 conteve apenas o 294.144.3. O segundo ensaio envolveu uma repetição do ELISA no modo de “captura” apenas desta vez, por causa da concentração de anticorpo específico mais alta nos sobrenadantes quando comparada com os sobrenadantes de cultura original mestre de 24 reservatórios, uma curva de titulação mais completa foi obtida e deixada para a determinação de um EC50 para a ligação de anticorpo à IL-31-CEE. Os resultados são mostrados na Tabela 3 (junto com os resultados de compartimentação e a% de inibição da atividade de IL-31-CEE no ensaio de neutralização com base em célula) e indicaram que houve uma ampla faixa em valores EC50 (e por dedução, a afinidade dos mAbs para IL-31-CEE) para os vários mAbs.

Tabela 3. Dados Resumidos para o Sobrenadante de Cultura de Clone da Primeira Rodada de Hibridomas Neutralizadores de IL-31 Menos Potentes

Mab	Compartimento de Epítopo (Biacore)	EC ₅₀ (ng/ml) Para a captura de IL31-CEE	% de Neutralização da atividade de IL31 no ensaio com base em célula (sobrenadante não diluído)
291.78.4	3	10	94
292.152.4	2	182	25
292.154.4	2	57,7	76
294.35.2	2	22,2	82
294.144.3	4	13,4	75
294.146.5	2	10,2	94
294.154.5	2	15,8	88
294.155.6	3	172	53
294.158.5	3	119	31
294.163.2	3	24,2	47
292.64.6	1	3,4	100

Com ênfase na seleção de hibridomas que produzem mAbs que foram 1) em compartimentos epitópicos diferentes daquele de um bom mAb neutralizante (292.64.6) e 2) de afinidade mais alta como indicado por

uma EC50 baixa no ensaio do modo de captura, apenas os clones da primeira rodada 294.35.2, 294.144.3, 294.154.5 e 294.163.2 foram levados ao estado de clone final como descrito acima para mAbs neutralizadores mais potentes. Este esforço de subclonagem adicional produziu a seleção do seguinte grupo de clones finais: 294.35.2.6.3, 294.144.3.5, 294.154.5.6 e 294.163.2.1.

O isotipo IgG de camundongo do mAb produzido por cada um destes hibridomas foi determinado usando o teste IsoStrip de Anticorpo Monoclonal de Camundongo (Roche Applied Science). Todos os quatro mAbs foram descobertos pertencer à subclasse IgG1. As amostras de cada um dos quatro hibridomas foram depositadas com o depósito de patente da American Type Tissue Collection (ATCC, Manassas, VA) como um depósito original sob o Tratado de Budapeste e foram dados os seguintes Números de Acesso ATCC: clone 294.163.2.1 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831), clone 294.35.2.6.3 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872), clone 294.154.5.6 Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875), e clone 294.144.3.5 (Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873).

G. Reação cruzada de mAbs Anti-IL-31 humana de Camundongo com IL-31 de camundongo

Todos os sobrenadantes de clone da primeira rodada dos dez mAbs neutralizadores potentes assim como dos dez mAbs neutralizadores menos potentes foram testados quanto a sua capacidade para reconhecer IL-31 de camundongo pelo ELISA em mIL-31-CEE ligado à placa. Nenhuma reatividade cruzada foi observada com qualquer um dos mAbs indicando que os mAbs pareceram ter especificidade para a IL-31 humana. Além disso estes resultados mostraram que nenhum dos anticorpos reconheceram o rótulo de peptídeo CEE comum à extremidade de terminal C das moléculas recombinantes de IL-31 tanto humana quanto de camundongo usadas nestes estudos, uma determinação que não foi feita nos sobrenadantes de

reservatório mestre originais.

Exemplo 3

Ensaio de Luciferase do Receptor IL-31RA/OS MRbeta

O plasmídeo KZ134 foi construído com oligonucleotídeos complementares que contêm elementos de ligação do fator de transcrição STAT de 4 genes, que inclui um elemento indutível c-fos Sis modificado (m67SIE ou hSIE) (Sadowski, H. *et al.*, Science 261: 1739-1744, 1993), o p21 SIE1 do gene p21 WAF1 (Chin, Y. *et al.*, Science 272: 719-722, 1996), o elemento de resposta de glândula mamária do gene de β -caseína (Schmitt-Ney, M. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991) e um elemento indutível por STAT do gene Fcg RI, (Seidel, H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995). Estes oligonucleotídeos contêm extremidades compatíveis Asp718-XhoI e foram ligados, usando métodos padrão, em um vetor repórter da luciferase de vagalume receptor com um promotor c-fos (Poulsen, L. K. *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) digerido com as mesmas enzimas e contendo um marcador selecionável de neomicina. O plasmídeo KZ134 foi usado para transfectar células BaF3, usando métodos de transfecção e seleção padrão, para fabricar a linhagem de célula BaF3/KZ134.

Uma linhagem de célula indicadora BaF3/KZ134 estável, que expressa a IL-31RA de tamanho natural ou o receptor IL-31RA/OS MRbeta foi construída. Os clones foram diluídos, plaqueados e selecionados usando técnicas padrão. Os clones foram triados pelo ensaio de luciferase (ver B, abaixo) usando o meio condicionado de IL-31 humana ou proteína de IL-31 purificada como um indutor. Os clones com a resposta de luciferase mais alta (por intermédio do STAT luciferase) e o fundo mais baixo foram selecionados. As linhagens de célula de transfectante estáveis foram selecionadas. As linhagens de célula foram chamadas de BaF3/KZ134/IL-31RA ou BaF3/KZ134/IL-31RA/OS MRbeta dependendo dos receptores transfectados na linhagem de célula.

Similarmente, as linhagens de célula BHK também foram construídas usando os métodos aqui descritos e foram usadas nos ensaios de luciferase aqui descritos. As linhagens de célula foram chamadas de BHK/KZ134/IL-31RA ou BHK/KZ134/IL-31RA/OS MRbeta dependendo dos receptores transfectados na linhagem de célula.

As células BaF3/KZ134/IL-31RA e BaF3/KZ134/IL-31RA/OS MRbeta foram giradas e lavadas em meio isento de mIL-3. As células foram giradas e lavadas 3 vezes para garantir a remoção de mIL-3. As células foram depois contadas em um hemocitômetro. As células foram plaqueadas em um formato de 96 reservatórios a cerca de 30.000 células por reservatório em um volume de 100 µl por reservatório usando o meio isento de mIL-3. O mesmo procedimento foi usado para as células BaF3/KZ134 não transfectadas para o uso como um controle no ensaio subsequente. As células BHK/KZ134/IL-31RA ou BHK/KZ134/IL-31RA/OS MRbeta foram plaqueadas em um formato de 96 reservatórios a 15.000 células por reservatório em meio de 100 µl. as células BHK/KZ134 precursoras foram usadas como um controle.

A ativação por STAT das células BaF3/KZ134/IL-31RA, BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta, BHK/KZ134/IL-31RA ou BHK/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta é avaliada usando meio condicionado ou proteína purificada. Cem microlitros do meio condicionado diluído ou proteína são adicionados às células BaF3/KZ134/IL-31RA, BaF3/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta, BHK/KZ134/IL-31RA ou BHK/KZ134/IL-31RA/OSMRbeta. O ensaio usando o meio condicionado é feito em paralelo em células BaF3/KZ134 ou BHK/KZ134 não transfectadas como um controle. O volume de ensaio total é de 200 µl. As placas de ensaio são incubadas a 37° C, 5% de CO₂ por 24 horas tempo no qual as células BaF3 são pelotizadas pela configuração a 2000 rpm por 10 min. e o meio é aspirado e 25 µl de tampão de lise (Promega) são adicionados. Para a linhagem de célula BHK, a etapa de

centrifugação não é necessária visto que as células são aderentes. Depois de 10 minutos na temperatura ambiente, as placas são medidas quanto a ativação da construção repórter de STAT lendo-as em um luminômetro (Labsystems Luminoskan, modelo RS) que adicionou 40 µl de substrato de ensaio de luciferase (Promega) em uma integração de cinco segundos.

Exemplo 4

Ensaio de Luciferase em Linhagens de Célula Epitelial Transformada Humana por Intermédio da Infecção Transitória com um Gene Repórter STAT/SRE Adenoviral

A inibição, redução e/ou neutralização da atividade de IL-31 podem ser medidas pelo ensaio de luciferase. Por exemplo, as linhagens de célula humana transformada podem ser semeadas em placas de fundo chato de 96 reservatórios a 10.000 células/reservatório em meio de crescimento regular como especificado para cada tipo de célula. No dia seguinte, as células são infectadas com uma construção repórter de adenovírus, KZ136, a uma multiplicidade de infecção de 5000. O repórter KZ136 contém os elementos STAT além de um elemento de resposta de soro. O volume total é de 100 µl/reservatório usando DMEM suplementado com 2 mM de L-glutamina (GibcoBRL), 1 mM de Piruvato de sódio (GibcoBRL) e 1x suplemento de Insulina-Transferrina-Selênio (GibcoBRL) (a seguir aludido como meio isento de soro). As células são cultivadas durante a noite.

No dia seguinte, o meio é removido e substituído com 100 µl de meio de indução. O meio de indução é a IL-31 humana diluída em meio isento de soro a 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml e 1,56 ng/ml. Um controle positivo de 20% de FBS é usado para validar o ensaio e para garantir que a infecção pelo adenovírus seja bem sucedida. As células são induzidas por 5 horas tempo no qual o meio é aspirado. As células são depois lavadas em 50 µl/reservatório de PBS e subseqüentemente lisadas em 30 µl/reservatório de 1X tampão de lise de célula (Promega). Depois de

uma incubação de 10 minutos na temperatura ambiente, 25 µl/reservatório de lisado são transferidos para placas brancas opacas de 96 reservatórios. As placas são depois lidas no Luminômetro usando a integração de 5 segundos com injeção de 40 µl/reservatório de substrato de luciferase (Promega).

5 Exemplo 5

Inibição da Produção de Citocina pelos Anticorpos IL-31

A IL-31 mostrou estimular a produção de IL-6 em DU145 (linhagens de célula doentes e normais); assim como estimular uma linhagem de célula A549 (doente e normal) para estimular a produção de IL-8 e para
10 reduzir a produção de IL-8 em linhagens de célula U2OS (doente e normal). Ver o pedido de patente U.S. publicado (Ver, a publicação número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003). Visto que a atividade dos anticorpos monoclonais IL-31 aqui descritos pode ser medida por uma inibição, redução e/ou neutralização da atividade de IL-31 nestas linhagens de
15 célula epitelial de estado de doença humana.

A. Inibição da Produção de Citocina pela linhagens de célula epitelial de estado de doença humana cultivadas com IL-31 humana

As células são plaqueadas a uma densidade de $4,5 \times 10^5$ células por reservatório em uma placa de 6 reservatórios (Costar) e cultivadas
20 no respectivo meio de cultivo. As células são cultivadas com reagentes de teste; 100 ng/ml de IL-31 (com e sem a inoculação de anticorpo), 10 ng/ml de Interferon gama (IFN gama) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de Fator alfa de Necrose de Tumor (TNF alfa) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de IL-1beta (R&D Systems, Minneapolis, MN) ou 100 ug/ml
25 de Lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma). Os sobrenadantes são colhidos em 24 e 48 horas e ensaiados quanto às citocinas; GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago), IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 (Proteína 1 Químioatraente de Macrófago) e TNFa. Os kits Multiplex Antibody Bead da BioSource International (Camarillo, CA) foram usados para medir citocinas

nas amostras. Os ensaios são lidos em um instrumento Luminex-100 (Luminex, Austin, TX) e os dados são analisados usando o software MasterPlex (MiraiBio, Alameda, CA). A produção de citocina (pg/ml) para cada linhagem de célula nas amostras de 24 horas é medida.

5 B. Inibição da Produção de Citocina pelas linhagens de célula epitelial humana normal cultivadas com IL-31 humana

As células são plaqueadas a uma densidade de 1×10^5 células por reservatório em uma placa de 24 reservatórios e cultivadas com reagentes de teste; 1000 ng/ml, 100 ng/ml e 10 ng/ml de IL-31 (com e sem inoculação
10 de anticorpo), 10 ng/ml de TNF α , 10 ng/ml de OSM, 10 ng/ml de IFN α , 10 ng/ml de TGF β ou 10 ng/ml de Linfotactina. Os sobrenadantes são colhidos em 24 e 48 horas e ensaiados quanto as citocinas; IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES e Eotaxina. As citocinas são ensaiadas como previamente descrito. A produção de citocina (pg/ml) para cada linhagem de célula nas amostras de
15 48 horas é medida.

C. Inibição da Produção de Citocina pela linhagens de célula epitelial de estado de doença humana co-cultivada com IL-31 humana e IFN gama

As células são plaqueadas a uma densidade de 2×10^5 células por reservatório em placa de 24 reservatórios e co-cultivadas com 10 ng/ml de
20 IFN gama +/- IL-31 a 100 ng/ml, 10 ng/ml ou 1 ng/ml. Os sobrenadantes foram coletados em 24 e 48 horas e ensaiados f (com e sem inoculação de anticorpo) ou IL-8 e MCP-1. A produção de citocina (pg/ml) para cada linhagem de célula nas amostras de 24 horas é medida.

Exemplo 6

25 Inibição dos Efeitos de IL-31 sobre a Adesão de monócito U937 à Monocamada de Célula Endotelial da Medula Óssea Transformada (TRBMEC)

Foi mostrado que a IL-31 sinergizada pode efetuar a aderência basal de células U937 às monocamadas endoteliais. Em particular, a IL-31

sinergizada com TNFalfa e ainda realçou a adesão de U937. Ver o pedido de patente U.S. publicado (Ver, a publicação número 20030224487, Sprecher, Cindy *et al.*, 2003. Assim a inibição de IL-31 pelos anticorpos anti-IL-31 aqui descritos pode ser medida com o seguinte ensaio.

5 As Células Endoteliais da Medula Óssea Transformada (TRBMEC) são semeadas em clusters de tecido de 96 reservatórios (Falcon) a uma densidade de 25.000/reservatório em meio M131 (Cascade Biologics) suplementado com Suplemento de Crescimento Microvascular (MVGS) (Cascade Biologics). Na confluência (24 horas mais tarde), as células são
10 trocadas para M199 (Gibco-Life Technologies) suplementado com 1% de Soro Bovino Fetal (Hyclone). A IL-31 recombinante humana (reagente de teste) é adicionada em várias concentrações (de 0,4 a 10 ng/ml) com e sem a inoculação de anticorpo, para testar quanto ao efeito da proteína nas interações de célula imune-célula endotelial que resultam na adesão. Alguns
15 reservatórios recebem 0,3 ng/ml de Fator de Necrose de Tumor (TNFalfa R&D Systems), uma citocina pró-inflamatória conhecida, além da IL-31, para testar um efeito da proteína sobre as células endoteliais sob condições inflamatórias. TNFalfa sozinho a 0,3 ng/ml é usado como controle positivo e a concentração usada representa aproximadamente 70% do efeito de TNFalfa
20 máximo neste sistema, isto é, não induz a aderência máxima de células U937 (uma linhagem de célula como monócito humano) para o endotélio. Por esta razão, este ajuste pode detectar tanto a super regulagem quanto a infra regulagem dos efeitos de TNFalfa. Os níveis basais de adesão tanto com e sem TNFalfa são usados como referência para avaliar o efeito de reagentes de
25 teste.

Depois da incubação durante a noite das células endoteliais com os reagentes de teste, as células U937, tingidas com 5 μ M de marcador fluorescente Calceína-AM (Molecular Probes), as células são colocadas em suspensão em RPMI 1640 (nenhum vermelho de fenol) suplementado com

1% de FBS e plaqueadas a 100.000 células/reservatório na monocamada de TRBMEC enxaguada. Os níveis de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/538 nm (leitora de micro-placa Molecular Devices, aplicação em CytoFluor) são medidos 30 minutos mais tarde, antes e
 5 depois de enxaguar o reservatório três vezes com RPMI 1640 quente (nenhum vermelho de fenol), para remover a U937 não aderente. Os níveis de fluorescência pré-enxágüe (total) e pós-enxágüe (específica de aderência) são usados para determinar a aderência percentual (aderente líquido/total líquido x 100 = % de aderência).

10 Exemplo 7

Protocolo do Bioensaio de IL-31

As células BAF3 transfectadas com hzCYTOR17 (IL-31RA), hOS MRB e KZ134 são cultivadas a 5×10^5 e 1×10^6 células/ml. As células são lavadas com meio de ensaio (RPMI 1640, 10% de FBS, L-Glutamina,
 15 Piruvato de sódio e Pen/Strep (todos Gibco)) e recolocadas em suspensão a 3×10^5 célula/ml em meio de ensaio. Em uma placa opaca de 96 reservatórios, os padrões de hIL-31 são titulados em duplicata a partir de 600 pg/ml a 9,38 pg/ml em meio de ensaio por intermédio de 100 µL/reservatório, de uma
 diluição 1:2 em série. Os padrões de controle de qualidade são adicionados
 20 em duplicata à placa a 350 pg/ml e 35 pg/ml em 100 µL. As amostras de teste são freqüentemente diluídas a 1:2 ou 1:4 e adicionadas em duplicata aos reservatórios de amostra. 100 µL das células são adicionadas a cada reservatório para uma concentração final de 3×10^4 células/reservatório. A placa é incubada por 16 a 24 horas a +37° C em um incubador a 5% de CO₂.
 25 A placa é centrifugada a 1200 RPM por 5 minutos, o meio removido com um peteleco e 25 µL/reservatório de tampão de lise (Promega) adicionados a cada reservatório. Depois de 10 minutos a placa é lida em um luminômetro (Berthold). O luminômetro adiciona 40 µL/reservatório de mistura de substrato de luciferase (Promega) e integrou a luminescência por um período

de 4 segundos. Os valores de luminescência são exportados para uma planilha onde os mesmos são analisados e convertidos em picogramas de IL-31 por 10^6 células por ml de volume.

Exemplo 8

5 Envolvimento de IL-31 no Início e Perpetuação da Hiper-Sensibilidade de Contato *In Vivo*

Método I

Camundongos BALB/c são pintados no dorso raspado com 25 μ l de DNFB a 0,5% dissolvido (2,4, dinitro-fluoro-benzeno, Sigma, St. Louis MO) em solução de acetona:óleo de oliva (4:1) usando um pipetador. Um grupo de controle de veículo recebe apenas 25 μ l de acetona:óleo de oliva. Depois de 5 dias, os camundongos são anestesiados com isofluorano em uma câmara de inalação e as aurículas tanto dos animais experimentais quanto dos de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para se obter uma medição de referência. Os camundongos são depois inoculados aplicando-se 10 μ l de DNFB a 0,25% em acetona:óleo de oliva (4:1) a ambos os lados de cada orelha de todos os camundongos. A hiper-sensibilidade de contato é medida em 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita (inoculada) e a orelha esquerda (não inoculada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro. Os valores de fundo são determinados pela diferença no inchaço da orelha entre as orelhas inoculadas e não inoculadas de camundongos ingênuos.

O sangue integral e o soro para a análise de FACS e/ou ELISA são coletados antes do sacrifício e as orelhas são coletadas para histologia.

25 Método II (Induz respostas Th2)

Camundongos BALB/c são pintados no dorso raspado com 100 μ l de FITC a 0,5% (isotiocianato de fluoresceína) em uma solução 1:1 de acetona/ftalato de dibutila (MSDS disponível usando pipetador nos dias 1, 2 e 8. No dia 13, os camundongos são anestesiados com isofluorano em uma

câmara de inalação e as aurículas tanto dos animais experimentais quanto dos de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para se obter uma medição de referência. Os camundongos são inoculados pela aplicação de 25 µl de FITC a 0,5% (em 1:1 acetona/ftalato de dibutila) à superfície dorsal de cada orelha. A hiper-sensibilidade de contato é medida a 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita (inoculada) e a orelha esquerda (não inoculada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro. Os valores de fundo são determinados pela diferença no inchaço da orelha entre a orelha inoculada e a não inoculada de camundongos ingênuos. O sangue integral e o soro para as análises de FACS e/ou ELISA são coletados antes do sacrifício e as orelhas são coletadas para histologia.

Método III (induz respostas Th1)

Os camundongos BALB/c são pintados no dorso raspado com 25 µl de oxazalona a 2% (em 4:1 de acetona/óleo de oliva) usando pipetador. No dia 7, os camundongos são anestesiados com isoflurano em uma câmara de inalação e as aurículas tanto dos animais experimentais quanto dos de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para se obter uma medição de referência. Os camundongos são inoculados aplicando-se 8 µl de oxazalona à superfície dorsal de cada orelha. A hipersensibilidade de contato foi medida a 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita (inoculada) e a orelha esquerda (não inoculada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro. Os valores de fundo são determinados pela diferença no inchaço da orelha entre as orelhas inoculadas e as não inoculadas de camundongos ingênuos. O sangue integral e o soro para as análises de FACS e/ou ELISA são coletados antes do sacrifício e as orelhas são coletadas para histologia.

O envolvimento de IL-31 no início e perpetuação da hiper-sensibilidade de contato é testado usando os anticorpos aqui descritos contra

IL-31 tanto na fase de sensibilização quanto na de inoculação do experimento.

Exemplo 9

Envolvimento de IL-31 na Dermatite Atópica *In Vivo*

Métodos I (Sensibilização de camundongos NC/Nga)

5 Camundongos NC/Nga machos foram adquiridos da CRL
Japão. Os camundongos tiveram 4 semanas de idade na chegada e alojados
em condições de quarentena SPF por 4 semanas para aclimatrem. Os
camundongos tiveram aproximadamente 10 a 11 semanas de idade no início
da sensibilização com antígeno. Os camundongos foram anestesiados com
10 isoflurano e os dorsos foram raspados com tesoura elétrica.
Aproximadamente 10 µg de extrato *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp)
(Indoor Biotechnologies, encomenda especial) foi injetado intradermicamente
na nuca do pescoço 3 vezes por semana por 5 a 6 semanas até que os
camundongos desenvolvessem lesões de pele. Os animais de controle
15 receberam 10 µl de injeções intradérmicas de PBS 3 vezes por semana. O
extrato de Dp foi preparado de acordo com o método por Matsuoka e colegas.
Matsuoka H., *et al.*, Allergy: 58, 139 (2003). Em resumo, 595 mg de extrato
de cultura gasta de Dp liofilizado foram dissolvidos em 12 ml de PBS estéril
(Gibco). O Dp foi misturado em um tubo Falcon de 50 ml em um oscilador de
20 agitação por 30 minutos. O extrato foi girado por 10 minutos a 2000 rpm e o
sobrenadante foi coletado e aliquoteado em tubos criofrasco de 1 ml e
armazenados a -20°C.

Métodos II (Sensibilização de camundongos DO11.10)

25 Camundongos transgênicos DO11.10 foram gerados a partir de
uma colônia interna e foram entre 9,5 e 14 semanas de idade no início da
sensibilização com antígeno. 24 horas antes da sensibilização epicutânea os
camundongos foram anestesiados com isoflurano e o tronco inteiro (dorso e
abdômen) dos camundongos foi raspado com tesoura elétrica. Os
camundongos foram depois listrados com fita com fita cirúrgica Elastin

(Johnson e Johnson) no dorso. 1 cm² de pedaços de gase estéril foram umedecidos com 500 µg de ovalbumina (Calbiochem 32467) ou PBS estéril (Gibco) e aderidos às nádegas esquerdas dos camundongos com DuoDerm Extra Thin Dressing (ConvaTec 187932). O emplastro e o curativo foram
 5 depois cobertos em uma coberta de corpo da fita cirúrgica Elastin de modo que os camundongos não pudessem remover ou destruir os emplastros. Os emplastros foram usados por 7 dias e removidos. Os camundongos foram repousados por duas semanas antes de ter uma outra rodada de sensibilização epicutânea. Os camundongos receberam um total de três sensibilizações por
 10 semana.

Resultados

A análise de imunoistoquímica da expressão de IL-31RA em pele lesional e não lesional de animais NC/Nga sensibilizados com ácaro de poeira e DO11.10 sensibilizados com OVA mostrou que IL-31RA é
 15 expressado pelos queratinócitos epidérmicos em camundongos, entretanto nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão pôde ser encontrada entre os animais sensibilizados com antígeno versus sensibilizados com PBS.

Exemplo 10

Inibição de Coceira pela Administração de Anticorpos anti-IL-31 de 20 camundongo de rato

Em um outro estudo com camundongo NC/Nga, camundongos NC/Nga machos (SLC, Tóquio), idade de 4 semanas foram expostos aos camundongos NC/Nga que já exibiam dermatite branda a moderada. Em sete semanas os camundongos foram divididos em três grupos e receberam os
 25 seguintes tratamentos. A cada quinto dia por sete semanas os camundongos em um grupo foram administrados com injeções de IL-31 anti-camundongo de rato a 10 mg/kg; um grupo foi administrado com injeções de albumina sérica de camundongo; e o terceiro grupo não recebeu nenhum tratamento. Os camundongos foram avaliados clinicamente duas vezes por semana quanto a

gravidade das lesões de pele. Especificamente, o envolvimento da pele (0 = nenhum envolvimento; 1 = dorso envolvido; 2 = dorso e face; 3 = dorso, face e orelhas) e a gravidade das lesões (0 = pele normal; 1 = escamosa e seca; 2 = lesões nodulares; 3 = lesões sanguinolentas). Além disso, a coceira foi avaliada. A coceira do camundongo usando as suas patas traseiras foi automaticamente detectada e objetivamente avaliada usando MicroAct (Neuroscience, Tóquio, Japão). Um magneto revestido com Teflon pequeno foi implantado subcutaneamente no lado dorsal de ambas as patas traseiras dos camundongos sob anestesia de Ketalar/Xilazina. Os camundongos com magnetos foram colocados em uma câmara de observação circundada por um bobina em volta. A corrente elétrica induzida na bobina pelo movimento dos magnetos foi amplificado e registrado. O programa de análise usou os seguintes ajustes para registrar os eventos de coceira: Patamar (V) 0,1; Intervalo de Evento (s) 0,2; Questão Máx (HZ) 20,0; Questão Min (Hz) 2,0; e Duração Min (s) 1,5. Nota: no modelo de camundongo NC/Nga, o comportamento de coceira de longa duração (> 1,5 s), mas não o de curta duração (0,3 a 1,5 s) estão relacionados com a sensação de coceira específica da dermatite em camundongos. Os pontos finais primários globais medidos foram coceira, dermatite e peso corporal.

20 Resultados:

Assumindo o período inteiro, o tratamento com o anticorpo anti-IL-31 de camundongo de rato não atingiu os pontos de final primários. Entretanto, a análise adicional revelou uma redução significativa de coceira pelo tratamento com o anticorpo anti-IL-31 no mesmo intervalo de tempo de 22 a 43 dias. Neste período de tempo, como para o período inteiro, o tratamento com anticorpos anti-IL-31 não afetou o desenvolvimento de lesões como a dermatite atópica e não normalizou o ganho de peso dos animais doentes, talvez devido ao início demorado das manifestações clínicas ou pelos auto-anticorpos neutralizadores no término do tratamento. Neste experimento, o comportamento de coceira, mas não

de dermatite, já foi aumentado entre a maioria dos animais no tempo quando o tratamento com o anticorpo foi iniciado.

Exemplo 11

Envolvimento de IL-31 em DTH *In Vivo*

5 Métodos

Para gerar uma resposta DTH, camundongos foram sensibilizados ao antígeno no dia 0 pela imunização subcutânea na base da cauda com 100 µg de ovalbumina (OVA) em Adjuvante Completo de Freund (CFA, 50 a 100 µl de volume total). Uma semana mais tarde os camundongos foram anestesiados com isofluorano em uma câmara de inalação e ambas as aurículas de animais experimentais e de controle foram medidos com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para se obter uma medição de referência. Os camundongos foram inoculados intradermicamente com 10 µg de OVA em PBS em um volume total de 10 µl na aurícula da orelha esquerda, exatamente abaixo da pele sem acertar nenhuma veia. Como um controle, os camundongos também receberam uma injeção de 10 µl de PBS na aurícula da orelha direita. Em alguns casos, um grupo de controle separado administrado com uma injeção i.d. de OVA na orelha também pôde ser tratado com corticosteróides tópicos como um controle positivo para inibir a reação. Nas 24 e 48 horas depois da inoculação, os camundongos foram anestesiados e a espessura das orelhas foi medida. Os resultados foram expressados como: Inchaço de orelha específico = (medição em 24 horas - medição em 0 hora) para a orelha experimental - (medição em 24 horas - medição em 0 hora) para a orelha de controle negativo. Endurecimento, a marca da DTH, é detectável em 18 horas depois da injeção de antígeno sensibilizado e é máximo em 24 a 48 horas. O atraso no início do endurecimento palpável é a razão para nomear a resposta “tipo demorado.”

Resultados

Camundongos transgênicos em IL-31 foram testados quanto a

DTH, entretanto, devido a um aumento na espessura da orelha nos animais transgênicos em IL-31 não inoculados, nenhuma diferença estatisticamente significativa no DTH pôde ser determinado entre os animais IL-31 Tg comparados com os controles do tipo selvagem. Os animais silenciados no receptor de IL-31 também foram testados em uma resposta DTH e nenhuma diferença significativa na resposta de DTH pôde ser observada entre os animais silenciados no receptor e do tipo selvagem.

Exemplo 12

Envolvimento de IL-31 na Indução da Resposta à Coceira

10 Métodos I (tratamento com Capsaicina de camundongos tratados com IL-31)

Os animais BALB/c de dez semanas de idade (CRL) foram anestesiados e injetados com um agente analgésico de longa duração, cloridreto de bupranorfina, subcutaneamente a 0,1 mg/kg antes da injeção de 0,25 ml de solução a 4 mg/ml de capsaicina em 10% de etanol + 10% de Tween-80 em solução salina subcutaneamente na nuca do pescoço. Os animais foram mantidos anestesiados por pelo menos 30 min a seguir do tratamento com a neurotoxina. Quarenta e oito horas mais tarde, bombas osmóticas de 14 dias foram implantadas subcutaneamente para a liberação contínua de 20 µg/dia de IL-31 por 14 dias. Os camundongos foram monitorados diariamente por 6 dias quanto a alopecia e prurido usando os seguintes critérios: 0 = nenhuma coceira, o animal parece normal, 1 = afinamento da pelagem em áreas pequenas, coceira observada, 2 = perda de pelo menor (pequenos pedaços), coceira, 3 = perda de pelo moderada, coceira e 4 = perda de pelo grave, coceira excessiva.

25 Os resultados demonstraram que embora os camundongos não tratados com a capsaicina mostrassem uma contagem de coceira/perda de pelo média de 2,625 a seguir de três dias de liberação de IL-31, os camundongos tratados com a capsaicina mostraram uma contagem significativa mais baixa de 1. Assim os camundongos tratados com capsaicina antes da liberação da

IL-31 mostraram tanto uma demora na incidência de coceira e perda de pelo quanto uma contagem mais baixa na intensidade da coceira e perda de pelo nos seis dias do experimento. Estes dados sugerem que IL-31 não induz nenhum componente neuronal que contribua para a alopecia e prurido induzidos pela IL-31. Portanto, a neutralização de IL-31 pode diminuir a incidência e intensidade da coceira e portanto da dermatite, em pacientes que sofrem de distúrbios de pele que envolvem a coceira.

Métodos II

Camundongos que são homozigotos nulos quanto ao gene *Tac1* não expressam nenhuma substância P ou neurocinina detectáveis. Estes camundongos têm respostas à dor nociceptiva significativamente reduzidas ao estímulo de moderado ao intenso e são portanto uma ferramenta útil para estudar a contribuição dos peptídeos de taquicinina para o processamento da dor/coceira e estados de doença inflamatória. Camundongos silenciados em *Tac1* de doze semanas de idade, foram implantados com bombas osmóticas de 14 dias liberando 1 µg/dia de proteína IL-31 e observados diariamente quanto a alopecia e prurido usando os seguintes critérios: 0 = nenhuma coceira, o animal parece normal, 1 = afinamento da pelagem em áreas pequenas, coceira observada, 2 = perda de pelo menor (pequenos pedaços), coceira, 3 = perda de pelo moderada, coceira e 4 = perda de pelo grave, coceira excessiva.

Os resultados deste estudo mostra que os camundongos deficientes em *Tac1* foram menos suscetíveis à coceira/perda de pelo induzidos pela IL-31 comparados com os camundongos de controle do tipo selvagem. Embora 100% (10/10) dos camundongos do tipo selvagem tivessem desenvolvido evidência de coceira e perda de cabelo em 6 dias de tratamento com IL-31, apenas 33,3% (2/6) dos camundongos deficientes em *Tac1* mostraram sinais de coceira e perda de cabelo no mesmo ponto de tempo. Estes dados mostram que a IL-31 induz um componente neuronal que contribui para o fenótipo de coceira/perda de cabelo em camundongos

tratados com IL-31 e a neutralização de IL-31 pode diminuir a incidência e intensidade da coceira no contexto da dermatite.

Métodos III (Administração de anticorpos neutralizantes de IL-31)

5 Camundongos BALB/c fêmeas normais (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de idade foram implantados subcutaneamente com bombas osmóticas de 14 dias (Alzet, #2002) liberando 1 µg/dia de mIL-31. Os grupos de camundongos receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de anticorpo monoclonal anti-IL-31 de camundongo de
10 rato 10 mg/kg (200 µg/camundongo) duas vezes por semana começando 1 semana antes da liberação de IL-31. Os grupos de controle de camundongos recebeu injeções i.p. de veículo (PBS/0,1% BSA) com os programas de dosagem idênticos. Os camundongos foram contados diariamente quanto a alopecia e prurido usando os seguintes critérios: 0 = nenhuma coceira, o animal parece normal, 1 = afinamento da pelagem em áreas pequenas, coceira
15 observada, 2 = perda de pelo menor (pequenos pedaços), coceira, 3 = perda de pelo moderada, coceira e 4 = perda de pelo grave, coceira excessiva.

Em todos os experimentos, os camundongos tratados com mAb anti-mIL-31 de rato tiveram uma demora no início dos sintomas de aproximadamente 5 a 7 dias e uma contagem global mais baixa quanto a
20 alopecia e prurido. Todos os grupos de camundongos tratados com mAb (independente da frequência de dose ou concentração) desenvolveram alopecia e prurido similares aos camundongos de controle em 13 dia do estudo. Estes dados sugerem que a neutralização de IL-31 pode retardar o início da resposta à coceira/perda de cabelo induzida pela IL-31.

25 Exemplo 13

Caracterização de Anticorpos monoclonais anti-ser humano de Camundongo IL-31

Um painel de 21 anticorpos monoclonais (mAbs) que produzem hibridomas clonais específicos para a interleucina 31 (IL31)

humana (recombinante) foi isolado. Dez mAbs fortemente neutralizantes que produzem hibridomas foram isolados. Estes foram designados a dois sub-compartimentos com base nos estudos de ligação competitiva. Onze mAbs fracamente neutralizantes que produzem hibridomas foram isoladas. Estes foram designados a 4 compartimentos adicionais com base em estudos de ligação competitiva. Um mAb funcionou bem para a Western Blotting e também funcionou bem para a imunoistoquímica. Três mAbs adequados para o uso como antagonistas competitivos foram identificados. Os anticorpos monoclonais adequados para o uso em immunoensaios intercalados também foram identificados.

A. Compartimentação de Epítopo por Biacore

Materiais: O anticorpo de captura foi IgG anti-camundongo de cabra - específico de Fc γ (Jackson #115-005-071); o anticorpo de bloqueio foi o fragmento Fc de IgG policlonal (Jackson Labs.); o antígeno: rIL31 Produzido em BHK com um rótulo de afinidade de CEE; Biacore 1000; chip ativado por Biacore CM5 NHS (Biacore, PN BR-1000-14).

Método: Os estudos foram realizados em um sistema Biacore1000®. BIAlogue v. 1.2 foi usado para programar métodos de condução. O anticorpo Fc anti-camundongo de cabra foi covalentemente imobilizado a um chip Biacore CM5 por intermédio de resíduos de lisina para formar a superfície de ligação ativa para o estudo. Cada um dos 21 sobrenadantes condicionados em meio clonal de mAb anti-huIL31 de camundongo foi injetado primeiro sobre a superfície de Fc anti-camundongo de cabra, de modo que o mAb primário a ser testado pôde ligar à superfície de anticorpo anti-camundongo em uma orientação favorável. Os sítios de ligação remanescentes foram depois bloqueados com injeção de um fragmento Fc de IgG policlonal irrelevante. O antígeno (rIL31) foi depois injetado e capturado para a superfície de anticorpo primário. Isto foi seguido por uma outra injeção de um dos 21 sobrenadantes condicionados em meio clonal de mAb anti-

huIL31 de camundongo para testar a ligação do anticorpo secundário. Se o mAb primário e secundário competiu quanto ao mesmo sítio de ligação no antígeno, o segundo mAb não ligou. Se os dois mAbs não competem quanto ao mesmo sítio de ligação no antígeno, o segundo mAb não liga.

5 Cada sobrenadante foi testado como o mAb primário em combinação com o conjunto inteiro de mAbs. Os ciclos de controle foram realizados para demonstrar a falta de resposta do mAb secundário na ausência de mAb primário ou antígeno. Cada mAb testado contra si mesmo foi usado como o controle negativo para estabelecer o nível de sinal de fundo. Os dados
10 foram compilados usando o software BioEvaluation 3.2 RCI, depois carregado no Excel[®] para o processamento de dados. Entre cada ciclo testando um par de anticorpo monoclonal, a superfície Fc anti-camundongo de cabra foi regenerada com lavagens de 2 x 30 segundos de HCl 50 mM.

Os mAbs que neutralizam fortemente (10) e os mAbs que
15 neutralizam fracamente (11) foram estudados em dois painéis separados, com a exceção de que quando os mAbs que neutralizam fracamente foram estudados, o mAb do hibridoma 292.64.6 foi incluído como um representante dos mAbs que neutralizam fortemente. Além disso, depois de revisar as medições de afinidade relativa e os dados de neutralização no contexto dos
20 compartimentos de epítipo para os dois primeiros painéis de compartimentação, um terceiro painel de compartimentação foi realizado em 8 mAbs “selecionados” incluindo mAbs que neutralizam tanto forte quanto fracamente.

Resultados: Três painéis que testam os pares de anticorpo
25 monoclonal foram completados para a análise tanto de mAbs que neutralizam fortemente quanto os que neutralizam fracamente. O primeiro painel testou todos os mAbs que neutralizam fortemente um contra o outro e o segundo painel testou todos os mAbs que neutralizam fracamente (e um mAb representativo que neutraliza fortemente do hibridoma 292.64.6) um contra o

outro. Um terceiro painel foi completado para avaliar explicitamente o emparelhamento de um subconjunto de mAb que neutraliza tanto forte quanto fracamente selecionado para outra avaliação.

Além de variações na resposta absoluta (RU) medida para pares de mAb diferentes, diversos dos pares de mAb comportam-se diferentemente quando a orientação dos pares mudou (isto é um mAb do par usado como um mAb primário vs secundário). Tal comportamento é freqüentemente observado e é no geral atribuído aos mAbs de interesse tendo epítomos sobrepostos.

Um do total de quatro compartimentos distintos foram obtidos a partir da análise dos primeiros dois painéis completos. Para o primeiro painel, todos os anticorpos fortemente neutralizadores agrupados juntos para definir um único compartimento (compartimento 1: 292.12.3, 292.39.5, 292.51.5, 292.63.5, 292.64.6, 292.72.3, 292.84.1, 292.105.4, 292.109.4, 292.118.6). No segundo painel, os anticorpos fracamente neutralizadores foram agrupados e 3 compartimentos principais adicionais (compartimento 2: 294.35.2, 294.146.5, 292.152.4, 292.152.4, 294.154.5; compartimento 3: 294.35.3, 291.78.4, 294.158.5, 294.155.6, 294.163.2; compartimento 4: 294.144.3) que foram distintos de um único representante do compartimento #1 (292.64.6). Adicionalmente, muitos dos emparelhamentos de mAb avaliados no painel 2 demonstraram uma clara assimetria de resposta dependendo da orientação em que os mAbs foram testados, indicando alguma sobreposição nos sítios de ligação. Dois mAbs do compartimento 3, 294.35.3 e 291.78.4, exibiram evidência de competição com mAbs no compartimento 2 quando testados como o mAb secundário. Também no painel 2, o anticorpo fortemente neutralizante 292.64.6 (compartimento 1) exibiu competição com mAbs no compartimento 3 quando testado como o anticorpo primário.

Depois da conclusão dos dois painéis de compartimentação iniciais, um grupo dos mAbs que neutralizam mais fortemente e os mAbs de

afinidade mais alta que neutralizam fracamente foram selecionados para outra avaliação e foram testados contra cada um no painel 3. Os resultados para o terceiro painel foram totalmente compatível com as rodadas anteriores mostrando que os anticorpos fortemente neutralizadores depositados juntos e os anticorpos fracamente neutralizadores separados nos compartimentos múltiplos estabelecidos. Além disso, o terceiro painel demonstrou uma sobreposição parcial na ligação de dois mAbs do compartimento 2 (294.35.2 e 292.154.4) com um subconjunto de mAbs designados ao compartimento 1 (292.12.3, 292.72.3, 292.84). Isto levou à designação de sub-compartimentos 1A e 1B dentro do compartimento 1. No painel 3, os mAbs dos hibridomas 292.163.2 (depósito3) e 292.144.3 (compartimento 4) depositados isoladamente.

B. Compartimentação de Epítopo em Placa de Microtítulo (ELISA Competitivo Isento de Rótulo)

Materiais: O anticorpo de captura foi o IgG anti-camundongo de cabra (específico de Fc γ) Jackson #115-005-071; o anticorpo de bloqueio foi a IgG1 de camundongo, (ZymoGenetics); os sobrenadantes do meio condicionado dos hibridomas foram usados para este estudo; o antígeno foi rIL31 Produzido em BHK com um rótulo de afinidade CEE biotinilado usando o kit um Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL); placas de 96 reservatórios Nunc Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, NY); ELISA B (PBS, 0,1% de Tween 20, 1% de BSA); estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL); substrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)

Método: Este método é similar ao ELISA competitivo isento de rótulo (LFC-ELISA) descrito por Nagata *et al* (2004). Este método para a compartimentação de epítopo utilizou rIL31 biotinilado. As placas de microtítulo foram revestidas a 100 μ L/reservatório com 1 μ g/ml de um anticorpo específico de Fc- γ de IgG anti-camundongo de cabra (Jackson ImmunoResearch #115-005-071) diluído em ELISA B (PBS, 0,1% de Tween

20, 1% de BSA). Depois da ligação deste anticorpo de revestimento por 3 horas na temperatura ambiente, cada meio condicionado contendo mAb foi diluído em ELISA B para produzir uma concentração de mAb aproximada de 0,5 µg/ml e deixado ligar às placas revestidas com IgG anti-camundongo de cabra durante a noite a 4°C (mAb#1). Em paralelo, um segundo conjunto de meio condicionado (mAb#2) foi diluído em tubos de teste de poliestireno a aproximadamente 0,5 µg/ml de mAb em ELISA B, misturado com 50 ng/ml de antígeno rIL31 biotinilado e incubado durante a noite a 4°C. Depois da incubação de mAb#1 com o anticorpo de revestimento, as placas foram bloqueadas com um anticorpo não relacionado para saturar os sítios de ligação desocupados na placa. As misturas de mAb#2-biotina-rIL31 foram adicionadas à placa e deixadas ligar. Como um controle para (não competição) no ensaio, 50 ng/ml de rIL31 biotinilado foi adicionado diretamente (sem pré-incubação com mAb#2) aos reservatórios contendo mAb#1 imobilizado. Depois da incubação com o complexo IL31-mAb#2 biotinilado, estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) foi adicionado à placa a 0,5 µg/ml. As placas foram desenvolvidas com substrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e a absorbância dos reservatórios individuais a 450 nm foi medida com uma leitora de placa (Molecular Devices Spectra Max340, Sunnyvale, CA). Se mAb#1 reconheceu um epítipo diferente de mAb#2, o complexo biotina-rIL31-mAb#2 ligou à placa resultando em uma leitura de absorbância alta. Se mAb#1 reconheceu o mesmo epítipo como mAb#2, o complexo biotina-rIL31-mAb#2 não liga à placa resultando em uma leitura de absorbância baixa.

Resultados: O painel completo de 21 mAbs foram testados contra eles mesmos simultaneamente em uma série de seis placas de microtítulo de 96 reservatórios. Os valores de absorbância a 450 nm (A450nm) foram registrados para cada combinação e orientação e compilados. Em todos os casos, os valores de absorbância baixos foram

obtidos para as combinações *self-self*. Além do controle *self-self*, um controle positivo de 50 ng/ml de rIL31-biotina (sem competir mAb#2) foi testado usando cada mAb primário em cada placa. Duas amostras de controle positivo foram obtidas para cada mAb primário e os valores das amostras em duplicata foram similares. Os valores de absorbância obtidos dos reservatórios de controle positivo (sem mAb#2) para 9 dos 11 mAbs que neutralizam fracamente (dos compartimentos 2, 3 ou 4) foram menores do que os valores de absorbância medidos para as amostras de controle para os mAbs remanescentes. Presumivelmente isto foi devido à afinidade mais baixa (EC50 mais alto) para aqueles mAbs. Para facilitar a interpretação dos resultados, os valores de absorbância foram normalizados de modo que a absorbância máxima medida para qualquer combinação de mAbs através de uma fileira (mAb de captura (mAb#1) mantido constante) foi designado um valor de 100%. Os valores normalizados caíram em dois grupos distintos: Um de grupo grande de valores caíram abaixo de um valor de 32% compatível com a competição e um segundo grupo grande de valores caíram acima de 32% compatível com uma falta de competição. O valor de patamar de 32% foi usado para designar cada combinação e orientação de mAbs a uma de duas categorias separadas (não competição e competição). Usando os dados categorizados, a compartimentação foi realizado automaticamente com base em um algoritmo de formação de grupo hierárquico. Como foi observado durante os experimentos de compartimentação usando o Biacore, alguns pares de mAbs categorizados de maneira diferente dependendo de qual mAb foi usado como o mAb primário. Um alto nível de severidade, que requer competição em ambas as orientações, foi usado para designar os mAbs para os compartimentos primários. Subseqüentemente um critério menos severo, que requer competição apenas em uma orientação, foi usado para ajudar na designação dos mAbs aos sub-compartimentos com base nas diferenças menores no comportamento. Os dados normalizados foram agrupados de

acordo com as 5 designações de compartimento primário com base nos critérios de alta severidade. Adicionalmente, as combinações e orientações de mAbs são codificadas por cor (branco para competição e escuro para não competição) para ajudar na visualização das interações que levam à designação de mAbs aos sub-compartimentos.

Os resultados da compartimentação pelo ELISA competitivo são compatíveis com as designações de compartimento com base nos resultados dos estudos usando o Biacore. Usando os critérios de compartimentação severos, Os seguintes compartimentos foram definidos:

10 Compartimento #1 (contendo todos os mAbs que neutralizam fortemente): 292.72.3, 292.64.6, 292.63.5, 292.51.5, 292.39.5, 292.12.3, 292.118.6, 292.109.4, 292.105.4, 292.84.1

Compartimento #2: 294.35.2, 294.154.5, 294.146.5, 292.154.4, 292.152.4

15 Compartimento #3: 294.35.3, 294.163.2, 294.158.5, 294.155.6

Compartimento #4: 294.144.3

Compartimento #5: 291.78.4

Focalizando no compartimento #1, os mAbs de 3 dos hibridomas no compartimento #1 (292.72.3, 292.12.3, 292.84.1) demonstraram competição com 3 dos mAbs do compartimento #2 quando usados como o mAb secundário (mAb#2). Com base neste comportamento o compartimento 1 foi dividido em dois sub-compartimentos; #1A e #1B, com o compartimento #1B contendo os mAbs que competem com os mAbs do compartimento 2 quanto à ligação. O compartimento #1A contém 292.64.6, 292.63.5, 292.51.5, 292.39.5, 292.118.6, 292.109.4, 292.105.4. O compartimento #1B contém 292.72.3, 292.12.3 e 292.84.1.

Focalizando no compartimento #2, três interações distintas estão evidentes que foram usados para dividir o compartimento #2 em 3 sub-compartimentos. O compartimento #2A contém mAb do hibridoma

294.146.5, que compete com todos os mAbs tanto do compartimento #1 quanto do #2. O compartimento #2B contém mAbs dos hibridomas 294.35.2 e 294.154.5, que competem com mAbs (secundários) do compartimento #1. O compartimento #2C contém mAbs dos hibridomas 292.154.4 e 292.152.4, que competem com o mAb do compartimento #4 quando este é usado como o mAb secundário.

Focalizando nos compartimentos #3, #4 e #5: os mAbs no compartimento #3 (dos hibridomas 294.35.3, 294.163.2.1 e 294.155.6) competem com os mAbs tanto do compartimento #4 quanto do #5 quando eles são usados como mAbs secundários. Os mAbs nos compartimentos #4 (do hibridoma 294.144.3.5) e #5 são principalmente diferenciados pela sua interação com mAbs no sub-compartimento #2C (e as únicas propriedades de ligação do mAb do hibridoma 294.144.3 nas Western blots).

Quando o painel completo de 21 mAbs foi testado simultaneamente usando o formato LFC-ELISA, o compartimento 1 e os sub-compartimentos #1A e #1B foram claramente identificados. A sobreposição parcial dos compartimentos #2 e #3 também foi identificada quando o painel completo de mAbs foi testado simultaneamente e o compartimento #2 foi dividido em 3 sub-compartimentos. Um desvio menor das designações de compartimento com base nos dados Biacore foi a designação dos mAbs de hibridomas 291.78.4 e 294.144.3 a dois compartimentos distintos quando critérios rigorosos foram usados com os dados de LFC-ELISA. Com base nos estudos Biacore, o mAb do hibridoma 291.78.4 foi designado ao compartimento #3.

C. Medição de afinidade com base em placa

Materiais: O anticorpo policlonal de captura foi a IgG anti-camundongo de cabra (específico de Fcγ) (Jackson ImmunoResearch West Grove, Pennsylvania #115-005-071); o anticorpo policlonal de bloqueio foi a IgG anti-ser humano de camundongo, (Jackson ImmunoResearch, #209-005-

082); sobrenadantes de meio condicionado dos hibridomas foram usados para este estudo; o antígeno foi rIL31 produzido em BHK com um rótulo de afinidade CEE biotinilado usando o kit Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL); placas de 96 reservatórios Nunc Maxisorp (Nalge Nunc, Rochester, NY);
 5 ELISA B (PBS, 0,1% de Tween 20, 1% de BSA); estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL); substrato de TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD).

Método: Este método é similar àquele descrito por van Heyningen (1986). As placas de microtítulo foram revestidas a 100
 10 μL /reservatório com 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de um anticorpo específico de Fc- γ de IgG anti-camundongo de cabra (Jackson ImmunoResearch #115-005-071) diluído em ELISA B (PBS, 0,1% de Tween 20, 1% de BSA). Depois da ligação deste anticorpo de revestimento por 3 horas na temperatura ambiente, cada sobrenadante de anticorpo monoclonal purificado foi diluído em ELISA B
 15 para produzir e a concentração de mAb aproximada de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e deixada ligar à placa por 1 hora na temperatura ambiente. Uma diluição serial de antígeno rIL31 biotinilado foi preparada a partir de 500 ng/ml até 0 ng/ml em ELISA B e adicionada aos reservatórios. Depois da incubação com o antígeno biotinilado, estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foi
 20 adicionada à placa. As placas foram desenvolvidas com substrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) e a absorbância dos reservatórios individuais a 450 nm foi medida com uma leitora de placa (Molecular Devices Spectra Max340, Sunnyvale, CA). Os pontos em duplicata foram calculados em média e os dados foram analisados com um ajuste de quatro
 25 parâmetros. O valor “C” do ajuste do parâmetro 4 é relatado como o EC50 aparente (ng/ml) e é a concentração de biotina-rIL31 que produz uma resposta semi-máxima no ensaio.

Resultados: os ajustes de quatro-parâmetros foram obtidos a partir das curvas experimentais para todos os 21 dos mAbs. A concentração

de biotina-rIL31 que produz a resposta semi-máxima (EC50) no ensaio variou de 3,3 a 236 ng/ml, com todos os 10 dos mAbs que neutralizam fortemente exibindo valores EC50 baixo e comparáveis (3,3 a 4,4 ng/ml).

D. Western Blotting

5 Materiais: O antígeno foi produzidas por rIL31 em BHK com um rótulo de afinidade CEE; 4 a 12% de géis de Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA); Tampão de amostra não redutor (Invitrogen, Carlsbad, CA); Os padrões de peso molecular foram SeeBlue (Invitrogen); 1x tampão de condução MES (Invitrogen); tampão de Western A (50 mM de Tris
10 pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 0,05% de Igepal, 0,25% de gelatina); 0,2 µm de membranas de nitrocelulose (Invitrogen); IgG anti-camundongo de ovelha-HRP (Amersham, Piscataway, NJ); pAb de coelho purificado por afinidade específico para rIL31 (ZymoGenetics); Ig anti-coelho de burro-HRP (Amersham); Reagente quimioluminescente Lumi-Light Plus
15 (Roche, Mannheim, Alemanha); Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer)

Método: A capacidade dos mAbs para detectar rIL31 desnaturado e desnaturado/reduzido em um Western blot foi examinada neste estudo. O antígeno de rIL31 foi misturado com tampão de amostra redutor ou não redutor, aquecido a 70°C por 10 min depois carregado a 100 ng/linha em
20 4 a 12% de géis NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os padrões de peso molecular foram SeeBlue (Invitrogen) e a eletroforese foi realizada em tampão de condução 1X MES (Invitrogen). As faixas de proteína nos géis foram transferidos a 0,2 µm de membranas de nitrocelulose (Invitrogen) e bloqueadas durante a noite em 2,5% de leite em pó desnatado em tampão de
25 Western A (50 mM de Tris pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 0,05% de Igepal, 0,25% de gelatina). As membranas de nitrocelulose foram sondadas com cada anticorpo monoclonal em uma concentração aproximada de 0,1 µg/ml de mAb. As manchas foram depois sondadas com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase de rábano (IgG anti-camundongo de

ovelha-HRP; Amersham, Piscataway, NJ). Como um controle positivo, uma Western blot separada foi sondada com 0,1 µg/ml de um anticorpo policlonal de coelho específico para IL-31 (ZymoGenetics) e um anticorpo secundário conjugado à peroxidase de rábano (Ig anti-coelho de burro-HRP; Amersham).

5 As faixas nas Western blots foram detectadas com Reagente Lumi-Leve Plus (Roche, Mannheim, Alemanha) e a quimioluminescência registrada em um Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer).

Resultados: A análise de Western Blot dos mAbs anti IL31 demonstraram que os mAbs de apenas três dos 21 hibridomas detectaram o
10 antígeno rIL31 desnaturado. O sinal mais forte foi obtido a partir do mAb produzido pelo hibridoma 294.144.3. Este mAb também detectou rIL3I reduzida/desnaturada mais fortemente do que a rIL31 não reduzida/desnaturada. A intensidade de sinal observada com este mAb foi similar àquela obtida com o controle de anticorpo policlonal. É notável que o
15 mAb do hibridoma 294.144.3 pertence a um compartimento separado dos outros mAbs avaliados. Os anticorpos monoclonais de dois outros hibridomas (292.84.1 e 292.64.6) detectaram rIL31 não reduzida/desnaturada muito fracamente mas não detectou a rIL31 reduzida/desnaturada. Este sinal fraco não reproduz nas manchas escaneadas. Ambos destes mAbs são anticorpos
20 neutralizadores do compartimento #1.

Exemplo 14

Afinidade de Ligação Relativa dos Anticorpos monoclonais Anti-Camundongo de Rato para o Ligando IL-31

A afinidade de ligação relativa de quatro MAb's de ligando
25 anti-Ms-IL-31 de rato contra o ligando IL-31 foi determinada como segue. O Clone 271.26.6.6.1, o Clone 271.33.3.2.1, o Clone 271.33.1.2.2 e o Clone 271.39.4.6.5 foram ensaiados. Anticorpo específico de IgG-Fcγ anti-Rato de Cabra (Jackson) foi imobilizado sobre um chip CM5 Biacore. Depois do teste preliminar, o ensaio foi ainda otimizado para ligar cada MAb na superfície de

captura anti-Rato e depois injetado em uma série de concentração de ligando IL-31 através do MAb para ver a associação e dissociação. Depois de cada rodada, a superfície foi regenerada de volta para o Anticorpo anti-Rato imobilizado com 2 injeções de 30 mM de HCl. Os dados foram gerados para cada MAb e o software de avaliação foi usado para definir os valores de cinética relativa.

Os dados de cinética relativa gerados pela avaliação das curvas de ligação de MAb-antígeno é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4

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

10 Exemplo 15

Redução de TARC e MDC em resposta ao anticorpo anti-IL-31 em modelos de camundongo AD

Método I

Camundongos NC/Nga machos de seis semanas de idade (CRL Japão) foram sensibilizados intradermicamente com 50 µg de extrato de ácaro de poeira (*D. pteronyssinus*, Indoor Biotechnologies) três vezes por semana no dorso e classificados quanto a lesões como a AD. Depois de 5 semanas de sensibilização os camundongos foram submetidos a eutanásia e as orelhas direitas foram excisadas e colocadas em um único reservatório de uma placa de cultura de 48 reservatórios (Corning) suplementadas com RPMI + 2% de FBS (GIBCO Invitrogen). As placas foram colocadas em incubadoras com 5% de CO₂ e umidade controlada. Os sobrenadantes foram coletados depois de 24 horas e congelados a -20 °C até outra análise.

Método II

25 Camundongos NC/Nga fêmeas de doze semanas de idade (CRL Japão) foram sensibilizados intradermicamente com 10 µg de SEB

(Toxin Technology) na orelha e no dorso três vezes por semana. Os camundongos foram classificados quanto as lesões equivalentes à AD. Depois de 5 semanas de sensibilização os camundongos foram submetidos a eutanásia e punções de biópsia de 6 mm foram coletadas da orelha injetada de cada camundongo e colocadas em um único reservatório de uma placa de cultura de 48 reservatórios suplementados com RPMI + 2% de FBS. As placas foram colocadas em incubadoras com 5% de CO₂ e umidade controlada. Os sobrenadantes foram coletados depois de 24 horas e congelados a -20 °C até outra análise.

Os grupos de camundongos em ambos os estudos foram tratados com um anticorpo monoclonal anti-IL-31 de camundongo de rato a 10 mg/kg ou veículo, intraperitonealmente duas vezes a cada semana partindo depois de 1 a 2 semanas de sensibilização.

As concentrações de TARC e MDC nas amostras de sobrenadante de 24 horas foram medidas pelo ELISA convencional (R&D Systems).

As concentrações de TARC e MDC foram mais baixas nos sobrenadantes de orelha de camundongos tratados com anti-IL-31 comparado com os camundongos de controle em ambos os estudos, entretanto, estes resultados não foram estatisticamente significantes quando analisados pelo ANOVA, provavelmente devido ao tamanho da amostra pequeno. Quando os dados de ambos os experimentos são combinados e analisados existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados.

Exemplo 16

Administração de anticorpos neutralizantes de IL-31

Os camundongos BALB/c fêmeas normais (CRL) aproximadamente 8 a 12 semanas de idade foram implantados subcutaneamente com bombas osmóticas de 14 dias (Alzet, #2002) liberando 1 µg/dia de mIL-31. Os grupos de camundongos recebeu injeções

intraperitoneais (i.p.) de anticorpo monoclonal anti-IL-31 de camundongo de rato 10 mg/kg (200 µg/camundongo) duas vezes por semana começando na semana 1 antes da liberação de IL-31. Os grupos de controle de camundongos recebeu injeções i.p. de veículo (PBS/0,1% de BSA) com os programas de dosagem idênticos. Os camundongos foram classificados diariamente quanto a alopecia e prurido usando o seguinte critério: 0 = nenhuma coceira, o animal parece normal, 1 = afinamento da pelagem em áreas pequenas, coceira observada, 2 = perda de pelo menor (pequenos pedaços), coceira, 3 = perda de pelo moderada, coceira e 4 = perda de pelo grave, coceira excessiva.

Em todos os experimentos, os camundongos tratados com mAb anti-mIL-31 de rato tiveram uma demora do início dos sintomas de aproximadamente 5 a 7 dias e uma contagem global mais baixa quanto à alopecia e prurido. Todos os grupos de camundongos tratados com mAb (independente da frequência de dose ou concentração) desenvolveram a alopecia e prurido similares aos camundongos de controle nos 13 dias do estudo. Estes dados sugerem que a neutralização de IL-31 pode retardar o início da resposta à coceira/perda de cabelo induzida pela IL-31.

A partir do precedente, será avaliado que, embora as formas de realização específicas da invenção fossem aqui descritas com os propósitos de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem desviar do espírito e escopo da invenção. Conseqüentemente, a invenção não é limitada exceto como pelas reivindicações anexas.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

0-1	Formulário PCT/RO/134 (SAFE) Indicações relativas a microorganismos ou outro material biológico depositado (Regra 13bis do PCT)	
0-1-1	Preparado usando	PCT-SAFE [modelo EASY] Versão 3.51.005.180 MT/FOP 20060401/0.20.4rc.2.7
0-2	Nº do pedido internacional	
0-3	Referência do arquivo do Requerente ou do Agente	05-11PC
1	As indicações feitas abaixo referem-se ao microorganismo ou outro material biológico referido no relatório na:	
1-1	Página	20
1-2	Linha	25
1-3	Identificação do depósito	
1-3-1	Nome da instituição depositária	ATCC American Type Culture Collection
1-3-2	Endereço da instituição depositária	10801 University Vlvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Data de depósito	20 de junho de 2005 (29.09.2005)
1-3-4	Número de acesso	ATCC PTA-6815
1-4	Indicações adicionais	PTA-6816
1-5	Estados designados para que indicações sejam feitas	Todas as designações
2	As indicações feitas abaixo referem-se ao(s) microorganismo(s) depositado(s) ou outro material biológico referido na descrição em:	
2-1	Página	20
2-2	Linha	27
2-3	Identificação de depósito	
2-3-1	Nome da instituição depositária	ATCC American Type Culture Collection
2-3-2	Endereço da instituição depositária	10801 University Vlvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
2-3-3	Data de depósito	06 de julho de 2005 (06.07.2005)
2-3-4	Número de acesso	ATCC PTA-6829
2-4	Indicações adicionais	PTA-6830; PTA-6830; PTA-6831
2-5	Estados designados para que indicações sejam feitas	Todas as designações

3	As indicações feitas abaixo referem-se ao(s) microorganismo(s) depositado(s) ou outro material biológico referido na descrição em:	
3-1	Página	20
3-2	Linha	29
3-3	Identificação de depósito	
3-3-1	Nome da instituição depositária	ATCC American Type Culture Collection
3-3-2	Endereço da instituição depositária	10801 University Vlvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
3-3-3	Data de depósito	19 de julho de 2005 (19.07.2005)
3-3-4	Número de acesso	ATCC PTA-6871
3-4	Indicações adicionais	PTA-6872; PTA-6873; PTA-6874; PTA-6875
3-5	Estados designados para que indicações sejam feitas	Todas as designações
SOMENTE PARA USO DO ESCRITÓRIO RECEBEDOR		
0-4	Esta forma foi recebida com o pedido internacional (Sim ou não)	
0-4-1	Funcionário autorizado	
SOMENTE PARA USO DO ESCRITÓRIO INTERNACIONAL		
0-5	Esta forma foi recebida pelo escritório internacional em:	
0-5-1	Funcionário autorizado	

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Siadak, Anthony W.
 Bilsborough, Janine
 Florkiewicz, Elin
 Haran, Aaron C.

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIS IL-31 E MÉTODOS DE USO

<130> 05-11PC

<150> 60/678,918

<151> 2005-05-06

<150> 60/696,251

<151> 2005-07-01

<150> 60/711,600

<151> 2005-08-26

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 904

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (28)...(519)

<400> 1

```

ctgaagctgg ccttgctctc tctcgcc atg gcc tct cac tca ggc ccc tcg acg 54
                               Met Ala Ser His Ser Gly Pro Ser Thr
                               1           5
tct gtg ctc ttt ctg ttc tgc tgc ctg gga ggc tgg ctg gcc tcc cac 102
Ser Val Leu Phe Leu Phe Cys Cys Leu Gly Gly Trp Leu Ala Ser His
10           15           20           25
acg ttg ccc gtc cgt tta cta cga cca agt gat gat gta cag aaa ata 150
Thr Leu Pro Val Arg Leu Leu Arg Pro Ser Asp Asp Val Gln Lys Ile
           30           35           40
gtc gag gaa tta cag tcc ctc tcg aag atg ctt ttg aaa gat gtg gag 198
Val Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ser Lys Met Leu Leu Lys Asp Val Glu
           45           50           55
gaa gag aag ggc gtg ctc gtg tcc cag aat tac acg ctg ccg tgt ctc 246
Glu Glu Lys Gly Val Leu Val Ser Gln Asn Tyr Thr Leu Pro Cys Leu
           60           65           70
agc cct gac gcc cag ccg cca aac aac atc cac agc cca gcc atc cgg 294
Ser Pro Asp Ala Gln Pro Pro Asn Asn Ile His Ser Pro Ala Ile Arg
           75           80           85
gca tat ctc aag aca atc aga cag cta gac aac aaa tct gtt att gat 342
Ala Tyr Leu Lys Thr Ile Arg Gln Leu Asp Asn Lys Ser Val Ile Asp
           90           95           100           105
gag atc ata gag cac ctc gac aaa ctc ata ttt caa gat gca cca gaa 390
Glu Ile Ile Glu His Leu Asp Lys Leu Ile Phe Gln Asp Ala Pro Glu
           110           115           120
aca aac att tct gtg cca aca gac acc cat gaa tgt aaa cgc ttc atc 438
Thr Asn Ile Ser Val Pro Thr Asp Thr His Glu Cys Lys Arg Phe Ile
           125           130           135
ctg act att tct caa cag ttt tca gag tgc atg gac ctc gca cta aaa 486
Leu Thr Ile Ser Gln Gln Phe Ser Glu Cys Met Asp Leu Ala Leu Lys
           140           145           150
tca ttg acc tct gga gcc caa cag gcc acc act taaggccatc tcttcctttc 539
Ser Leu Thr Ser Gly Ala Gln Gln Ala Thr Thr
           155           160
ggattggcag gaacttaagg agccttaaaa agatgaccga cagctaagtg tgggaactct 599
gccgtgattc cttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctt catatgggct 659
agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
tattagtctt ggtatttatg gaatgctttt cttctgcagg cttaagtctt acttattata 779

```

ccctcgtgag ggtgggaggt ggcagctatg ttaatttatt gatatttatt gtactaagag 839
 ttgtcaatgc tccctggggg agccctcgga atctatttaa taaattatat tgaatttttc 899
 tcata 904

<210> 2

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 755

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

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

<400> 3

atg atc ttc cac aca gga aca acg aag cct acc ctg gtg ctg ctt tgc 48
 Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 tgt ata gga acc tgg ctg gcc acc tgc agc ttg tcc ttc ggt gcc cca 96
 Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
 20 25 30
 ata tcg aag gaa gac tta aga act aca att gac ctc ttg aaa caa gag 144
 Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
 35 40 45
 tct cag gat ctt tat aac aac tat agc ata aag cag gca tct ggg atg 192
 Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
 50 55 60
 tca gca gac gaa tca ata cag ctg ccg tgt ttc agc ctg gac cgg gaa 240
 Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
 65 70 75 80
 gca tta acc aac atc tcg gtc atc ata gca cat ctg gag aaa gtc aaa 288
 Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
 85 90 95
 gtg ttg agc gag aac aca gta gat act tct tgg gtg ata aga tgg cta 336
 Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
 100 105 110
 aca aac atc agc tgt ttc aac cca ctg aat tta aac att tct gtg cct 384
 Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
 115 120 125
 gga aat act gat gaa tcc tat gat tgt aaa gtg ttc gtg ctt acg gtt 432

Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
 130 135 140
 tta aag cag ttc tca aac tgc atg gca gaa ctg cag gct aag gac aat 480
 Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 145 150 155 160
 act aca tgc tgagtgatgg gggggggggg ggtgcagtgt cctcagcagt 529
 Thr Thr Cys
 gcctgtcctt cgagggctga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcggt 589
 cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649
 tgtagggact ggaagtggca gctatatatta tttatttatg tactgagttt gttaacgctc 709
 catggaggag ccttcagagt ctatttaata aattatattg acatga 755
 <210> 4
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 Met Ile Phe His Thr Gly Thr Thr Lys Pro Thr Leu Val Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Cys Ile Gly Thr Trp Leu Ala Thr Cys Ser Leu Ser Phe Gly Ala Pro
 20 25 30
 Ile Ser Lys Glu Asp Leu Arg Thr Thr Ile Asp Leu Leu Lys Gln Glu
 35 40 45
 Ser Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Tyr Ser Ile Lys Gln Ala Ser Gly Met
 50 55 60
 Ser Ala Asp Glu Ser Ile Gln Leu Pro Cys Phe Ser Leu Asp Arg Glu
 65 70 75 80
 Ala Leu Thr Asn Ile Ser Val Ile Ile Ala His Leu Glu Lys Val Lys
 85 90 95
 Val Leu Ser Glu Asn Thr Val Asp Thr Ser Trp Val Ile Arg Trp Leu
 100 105 110
 Thr Asn Ile Ser Cys Phe Asn Pro Leu Asn Leu Asn Ile Ser Val Pro
 115 120 125
 Gly Asn Thr Asp Glu Ser Tyr Asp Cys Lys Val Phe Val Leu Thr Val
 130 135 140
 Leu Lys Gln Phe Ser Asn Cys Met Ala Glu Leu Gln Ala Lys Asp Asn
 145 150 155 160
 Thr Thr Cys
 <210> 5
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Met Lys Leu Ser Pro Gln Pro Ser Cys Val Asn Leu Gly Met Met Trp
 1 5 10 15
 Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe Ser Leu Ala
 20 25 30
 Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr Tyr Tyr Arg
 35 40 45
 Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr Ser Tyr Thr
 50 55 60
 Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys His Asp Asn
 65 70 75 80
 Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser Cys Ser Phe
 85 90 95
 Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile Glu Val Glu
 100 105 110
 Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr Tyr Trp Arg
 115 120 125
 Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe Arg Val Lys
 130 135 140
 Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp Ile Lys Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu Arg Phe Arg
 165 170 175
 Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala Lys Asn Arg
 180 185 190
 Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln Pro Phe Thr
 195 200 205
 Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser Lys Phe Trp
 210 215 220
 Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu Ala Asp Gly
 245 250 255
 Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly Ala Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro Glu Ser Asn
 275 280 285
 Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln Leu Glu Leu
 290 295 300
 His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala Ile Gln Glu
 325 330 335
 Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val Ala Glu Asp
 340 345 350
 Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val Asn Thr Trp
 355 360 365
 Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr Thr Leu Ser
 370 375 380
 Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asp Lys
 385 390 395 400
 Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro Met Leu His
 405 410 415
 Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Gly
 420 425 430
 Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile Gly Val Lys
 435 440 445
 Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu Arg Lys Gly
 450 455 460
 Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly Gly Lys Gly
 465 470 475 480
 Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly Leu Glu Ser
 485 490 495
 Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala Ser Thr Ser
 500 505 510
 Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr Leu Ser Phe
 515 520 525
 Ser Val Phe Glu Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu
 530 535 540
 Leu Ile Leu Ile Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Pro Asn
 545 550 555 560
 Lys Leu Thr His Leu Cys Trp Pro Thr Val Pro Asn Pro Ala Glu Ser
 565 570 575
 Ser Ile Ala Thr Trp His Gly Asp Asp Phe Lys Asp Lys Leu Asn Leu
 580 585 590
 Lys Glu Ser Asp Asp Ser Val Asn Thr Glu Asp Arg Ile Leu Lys Pro
 595 600 605
 Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys Leu Val Val Asn
 610 615 620
 Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu Ala Arg Thr Gly
 625 630 635 640
 Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr Arg Ile Leu Ser
 645 650 655
 Ser Cys Pro Thr Ser Ile

660

<210> 6
 <211> 979
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

450		455		460	
Ile Leu Phe Tyr Asn	Val Val Val Glu Asn	Leu Asp Lys Pro Ser Ser			
465	470	475		480	
Ser Glu Leu His Ser	Ile Pro Ala Pro Ala Asn Ser Thr Lys Leu Ile				
	485	490		495	
Leu Asp Arg Cys Ser Tyr Gln Ile Cys Val Ile Ala Asn Asn Ser Val					
	500	505		510	
Gly Ala Ser Pro Ala Ser Val Ile Val Ile Ser Ala Asp Pro Glu Asn					
	515	520		525	
Lys Glu Val Glu Glu Glu Arg Ile Ala Gly Thr Glu Gly Gly Phe Ser					
	530	535		540	
Leu Ser Trp Lys Pro Gln Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Val Val Asp					
545	550	555		560	
Trp Cys Asp His Thr Gln Asp Val Leu Gly Asp Phe Gln Trp Lys Asn					
	565	570		575	
Val Gly Pro Asn Thr Thr Ser Thr Val Ile Ser Thr Asp Ala Phe Arg					
	580	585		590	
Pro Gly Val Arg Tyr Asp Phe Arg Ile Tyr Gly Leu Ser Thr Lys Arg					
	595	600		605	
Ile Ala Cys Leu Leu Glu Lys Lys Thr Gly Tyr Ser Gln Glu Leu Ala					
	610	615		620	
Pro Ser Asp Asn Pro His Val Leu Val Asp Thr Leu Thr Ser His Ser					
625	630	635		640	
Phe Thr Leu Ser Trp Lys Asp Tyr Ser Thr Glu Ser Gln Pro Gly Phe					
	645	650		655	
Ile Gln Gly Tyr His Val Tyr Leu Lys Ser Lys Ala Arg Gln Cys His					
	660	665		670	
Pro Arg Phe Glu Lys Ala Val Leu Ser Asp Gly Ser Glu Cys Cys Lys					
	675	680		685	
Tyr Lys Ile Asp Asn Pro Glu Glu Lys Ala Leu Ile Val Asp Asn Leu					
	690	695		700	
Lys Pro Glu Ser Phe Tyr Glu Phe Phe Ile Thr Pro Phe Thr Ser Ala					
705	710	715		720	
Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Phe Thr Lys Val Thr Thr Pro Asp Glu					
	725	730		735	
His Ser Ser Met Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val					
	740	745		750	
Leu Leu Ile Met Val Met Cys Tyr Leu Lys Ser Gln Trp Ile Lys Glu					
	755	760		765	
Thr Cys Tyr Pro Asp Ile Pro Asp Pro Tyr Lys Ser Ser Ile Leu Ser					
	770	775		780	
Leu Ile Lys Phe Lys Glu Asn Pro His Leu Ile Ile Met Asn Val Ser					
785	790	795		800	
Asp Cys Ile Pro Asp Ala Ile Glu Val Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr					
	805	810		815	
Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu					
	820	825		830	
Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu Pro Thr Glu Lys Asn His Ser					
	835	840		845	
Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala					
	850	855		860	
Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His Val Pro Val Ser Pro Lys Ala					
865	870	875		880	
Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala					
	885	890		895	
Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu					
	900	905		910	
Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp					
	915	920		925	
Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val Glu Ala Pro His Cys Ser Glu					
	930	935		940	
Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro					
945	950	955		960	

Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu
965 970 975
His Tyr Cys

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> peptídeo de etiqueta Glu-Glu

<400> 7
Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de ser produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830;
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831;
- f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

2. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; e
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830.

3. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; e
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871.

4. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 2,

caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; e
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830.

5 5. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873;
- 10 c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831.

6. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- 15 a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; e
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875.

7. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

20 8. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

9. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é capaz de inibir a ligação de
25 um peptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 a partir do resíduo 27 ao resíduo 164 a um receptor que compreende a seqüência de aminoácido como mostrado na SEQ ID NO: 5.

10. Anticorpo humanizado, caracterizado pelo fato de ser derivado de um anticorpo monoclonal produzido por um hibridoma

depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830;
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831;
- f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

11. Anticorpo humanizado de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo humanizado especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

12. Fragmento de anticorpo, caracterizado pelo fato de ser derivado de um anticorpo monoclonal produzido por um hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830;
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831;
- f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

13. Fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 12,

caracterizado pelo fato de que o dito fragmento de anticorpo é capaz de inibir a ligação de um peptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 a partir do resíduo 27 ao resíduo 164 a um receptor que compreende a seqüência de aminoácido como mostrado na SEQ ID NO: 5.

5 14. Fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito fragmento de anticorpo compreende ainda um polipeptídeo Fc.

10 15. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 11, em que o dito polipeptídeo é capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6874.

15 16. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO:2) com IL-31RA (SEQ ID NO: 5).

20 17. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo neutralizante.

25 18. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende ainda um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, rótulo de peptídeo, partícula magnética ou toxina.

 19. Anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende ainda PEGuilação.

 20. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo do

mesmo, caracterizado pelo fato de ser capaz de competir com o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- 5 a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830;
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831;
- 10 f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

15 para ligar ao peptídeo que compreende a seqüência de aminoácido a partir do resíduo 27 ao resíduo 164 da SEQ ID NO: 2.

21. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- 20 a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830.

25 22. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;

b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816; e

c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;

5 23. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829; e

b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830.

10 24. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;

b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873;

15 c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e

d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831.

20 25. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o hibridoma possui a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada do grupo consistindo de:

a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872; e

b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875.

25 26. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser para redução da inflamação em um mamífero.

27. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser para inibição, redução ou bloqueio da produção de quimiocinas pró-inflamatórias em um mamífero.

28. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser para inibição, redução ou bloqueio de TARC e MDC.

5 29. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de ser para inibição, redução, ou bloqueio de coceira, prurido, perda de cabelo ou dermatite (tal como dermatite atópica).

10 30. Uso de um antagonista de IL-31, caracterizado pelo fato de que compreende: (i) um anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo de ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo de IL-31RA ou fragmento do mesmo; ou (ii) um polipeptídeo de IL-31RA ou fragmento do mesmo; para a manufatura de um medicamento para tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória que a IL-31 desempenha um papel, em que, no uso, o medicamento reduz a atividade inflamatória de IL-31.

15 31. Uso de um antagonista de IL-31, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo de ligação que especificamente se liga a um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:2 ou um fragmento deste; para a manufatura de um medicamento para reduzir, inibir ou prevenir o efeito de prurido em um mamífero em que a IL-31 desempenha um papel; em que, no uso, o medicamento reduz a atividade prurítica ou a atividade de coceira da IL-31.

20 32. Uso de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a doença inflamatória compreende dermatite atópica ou doenças pruríticas tal como prurigo nodular.

25 33. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 30 a 32, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo é anticorpo ou fragmento de anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 23.

34. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que o hibridoma é depositado com a American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente ATCC selecionada de:

- a) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6815;
- 5 b) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6816;
- c) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6829;
- d) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6830;
- e) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6831;
- f) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6871;
- 10 g) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6872;
- h) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6875; e
- i) Designação de Depósito de Patente ATCC PTA-6873.

35. Fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito fragmento de anticorpo é humanizado.

RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL, ANTICORPO HUMANIZADO, FRAGMENTO DE ANTICORPO, USO DE UM ANTAGONISTA, E, HIBRIDOMA”

- 5 A presente invenção diz respeito a métodos de tratar doenças pruríticas, incluindo mas não limitadas à Dermatite de contato, Dermatite atópica, Reações alérgicas cutâneas do tipo demorada induzidas por medicamento, Necrólise epidérmica tóxica, Linfoma de célula T cutâneo, Pênfigo bolhoso, Alopecia wereata, Vitiligo, Acne Rosácea, Prurigo nodular,
10. Escleroderma, Vírus do herpes simples ou combinação destes pela administração de anticorpos monoclonais IL-31. A invenção fornece ainda os hibridomas que geram os anticorpos monoclonais.