



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

(11) PI 0821145-0 B1



(22) Data do Depósito: 05/12/2008

(45) Data de Concessão: 15/10/2019

(54) Título: USO DE UM ANTICORPO ANTI-NR10 COMO AGENTE PREVENTIVO OU TERAPÊUTICO PARA PRURIDO

(51) Int.Cl.: A61K 45/00; A61K 39/395; A61P 17/04; C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 05/12/2007 JP 2007-315144.

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

(72) Inventor(es): YOSHINOBU HIGUCHI; KEIKO KASUTANI; HIDETOMO KITAMURA; MASAKAZU HASEGAWA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2008072142 de 05/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/072598 de 11/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/06/2010

(57) Resumo: USO DE UM ANTICORPO ANTI-NR10 COMO AGENTE PREVENTIVO OU TERAPÊUTICO PARA PRURIDO A presente invenção isolou o clone BM095 de uma biblioteca de fago de anticorpo humano, o qual tinha uma forte atividade 5 inibitória de crescimento no sistema de ensaio de crescimento de célula Ba/F3 dependente de IL-31. Quando administrado a um camundongo modelo de prurido, o anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo exibiu um efeito de supressão de sintoma acentuado. Assim, foi revelado que anticor10 pos de neutralização anti-NR10 são úteis como agentes terapêuticos para prurido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UM ANTICORPO ANTI-NR10 COMO AGENTE PREVENTIVO OU TERAPÊUTICO PARA PRURIDO"**.

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a agentes para o tratamento ou prevenção de prurido.

Técnica Antecedente

Muitas citocinas são conhecidas como fatores humorais envolvidos no crescimento e diferenciação de vários tipos de células ou na ativação de funções de células maduras diferenciadas. Células estimuladas por citocina produzem diferentes tipos de citocinas, desse modo, formando redes de múltiplas citocinas no corpo. A homeostase biológica é mantida através de um equilíbrio delicado da regulação mútua entre citocinas nessas redes. Acredita-se que muitas doenças inflamatórias resultem de uma falha de tais redes de citocina. Assim, terapia anticitocina baseada em anticorpo monoclonal tem atraído muita atenção. Por exemplo, foi demonstrado que anticorpos anti-TNF e anticorpos antierreceptor de IL-6 são altamente eficazes clinicamente. Por outro lado, há muitos exemplos de falha onde nenhum efeito terapêutico foi produzido quando uma única citocina, tal como IL-4, foi bloqueada isoladamente, em virtude da ativação de vias compensatórias em condições patológicas reais.

Os presentes inventores tiveram sucesso no isolamento de um novo receptor de citocina, NR10, que era altamente homólogo ao gp130, um receptor para transdução de sinal de IL-6 (Documento de Patente 1). O NR10 forma um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR) e funciona como um receptor de IL-31 (Documento de Não Patente 1). A NR10 é também conhecida como glm-r (Documento de Não Patente 2), GPL (Documento de Não Patente 3), IL-31RA (Documento de Não Patente 4) e similares. Também foi reportado que camundongos transgênicos superexpressando IL-31 desenvolvem espontaneamente dermatite prurítica (Documento de Não Patente 4).

Contudo, não pode ser afirmado que expressão forçada de citocina em camundongos ou uma alta concentração de citocina no sangue em

camundongos patológicos são causas reais da doença. Não se sabe se o bloqueio de sinal por um anticorpo produz um efeito terapêutico. Por exemplo, camundongos transgênicos nos quais IL-18 é superexpressa em ceratinócitos desenvolvem dermatite prurítica. Nos camundongos NC/Nga modelos de dermatite atópica espontânea, a concentração de IL-18 no sangue aumenta com avanço das condições patológicas. A partir dessas descobertas, presume-se que a superexpressão de IL-18 seja a causa da doença. Na verdade, contudo, a administração de um anticorpo de neutralização não exibiu efeito terapêutico (Documento de Não Patente 5).

Assim, a inibição de função de citocina não produz necessariamente um efeito terapêutico em doenças com expressão elevada de citocina. Assim, é difícil prever, a partir do nível de expressão de uma citocina, sobre qual doença a inibição da citocina produz um efeito terapêutico. Portanto, é importante identificar doenças sobre as quais a inibição de sinalização de uma citocina-alvo realmente produz um efeito terapêutico.

Documentos da técnica anterior da presente invenção são descritos abaixo:

Documento de Patente 1: WO00/75314

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

Documento de Não Patente 2: A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. J Biol Chem 277, 16831-6, 2002

Documento de Não Patente 3: GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. J Biol Chem 278, 49850-9, 2003

Documento de Não Patente 4: Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol 5, 752-60, 2004

Documento de Não Patente 5: Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-

model mice NC/Nga., British Journal of Dermatology 149: 39-45, 2003.

Descrição da Invenção

Problemas a Serem Resolvidos pela Invenção

5 A presente invenção foi obtida em vista das circunstâncias descritas acima. Um objetivo da presente invenção é proporcionar agentes para o tratamento ou prevenção de prurido.

Meios para Resolver os Problemas

10 Os presentes inventores conduziram estudos dedicados para obter o objetivo descrito acima. Os presentes inventores descobriram que antagonistas de NR10, tais como anticorpos de neutralização de NR10, são úteis como agentes terapêuticos ou conservantes para prurido, desse modo, concretizando a presente invenção.

15 A presente invenção refere-se a agentes para o tratamento ou prevenção de prurido. Mais especificamente, a presente invenção proporciona:

1. um agente preventivo ou terapêutico para prurido, o qual compreende um antagonista de NR10 como um ingrediente ativo;
2. o agente preventivo ou terapêutico de [1], em que o antagonista de NR10 é um anticorpo tendo uma atividade de neutralização contra NR10;
- 20 3. o agente preventivo ou terapêutico de [2], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;
4. o agente preventivo ou terapêutico de [3], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal tendo uma atividade de neutralização contra NR10 humana;
- 25 5. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de [2] a [4], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante; e
6. o agente preventivo ou terapêutico de qualquer um de [2] a [5], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

Breve Descrição dos Desenhos

30 A figura 1 é um gráfico que mostra a avaliação do comportamento de se coçar induzido por IL-31. Média $\pm$ erro-padrão.

A figura 2 é um gráfico que mostra a avaliação do comportamen-

to de se coçar induzido por antígeno de ácaro. Média $\pm$ erro-padrão.

A figura 3 é um gráfico que mostra o curso de tempo das alterações de peso corporal percentual nos camundongos modelos de colite DSS.

5 A figura 4 é um gráfico que mostra o curso de tempo de alterações na espessura auricular no modelo de dermatite aguda induzida por cloreto de picrila.

A figura 5 é um gráfico que mostra o efeito de supressão de prurido do anticorpo anti-NR10 H0L0 avaliado usando o número de coceiras como um indicador.

10 Modo para Realização da Invenção

NR10 é uma proteína que forma um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR) e funciona como um receptor de IL-31. A NR10 é também conhecida como glm-r (J Biol Chem 277, 16831-6, 2002), GPL (J Biol Chem 278, 49850-9, 2003), IL-31RA (Nat Immunol 5, 752-60, 2004) e
15 similares. Assim, a NR10 na presente invenção também inclui proteínas designadas por esses nomes.

NR10 na presente invenção inclui aquelas derivadas de seres humanos, camundongos e outros mamíferos. NR10 preferidas incluem, sem limitação particular, aquelas derivadas de seres humanos e camundongos.
20 Existem muitas variantes com *splicing* conhecidas de NR10 derivada de ser humano (WO 00/075314). Das variantes com *splicing* descritas acima, NR10.1 consiste em 662 aminoácidos e contém um domínio transmembrana. NR10.2 é uma proteína receptor-like solúvel consistindo em 252 aminoácidos sem o domínio transmembrana. Entretanto, variantes com *splicing* de
25 NR10 conhecidas que funcionam como proteínas do receptor transmembrana incluem NR10.3 e IL-31RAv3. A NR10 humana da presente invenção não está particularmente limitada, na medida em que ela forme um heterodímero com o receptor de oncostatina M (OSMR) e funcione como um receptor de IL-31. NR10 preferidas incluem NR10.3 (também referida como ILRAv4 (Nat Immunol 5, 752-60, 2004)) e IL-31RAv3. NR 10.3 (IL-31RAv4) consiste em
30 662 aminoácidos (WO 00/075314; Nat Immunol 5, 752-60, 2004) e IL-31RAv3 consiste em 732 aminoácidos (Acesso ao GenBank No:

NM_139017). A sequência de aminoácido de IL-31RAv4 é mostrada em SEQ ID NO: 6 e a sequência de aminoácido de IL-31RAv3 é mostrada em SEQ ID NO: 7. Entretanto, NR10 derivadas de camundongo incluem proteínas compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5.

5 Na presente invenção, o termo antagonista de NR10 refere-se a uma substância que bloqueia a sinalização intracelular mediada pela ativação de NR10 através de ligação à NR10 e, assim, causa perda ou supressão da atividade biológica das células. A atividade biológica inclui, mas não está limitada a, por exemplo, atividades de indução ou supressão da produção de
10 uma substância bioativa (por exemplo, quimiocinas, citocinas inflamatórias e similares), atividades de promoção ou supressão da secreção de uma substância bioativa, atividades de crescimento, atividades de indução de crescimento, atividades de sobrevivência, atividades de diferenciação, atividades de indução de diferenciação, atividades transcricionais, atividades de transporte de membrana, atividades de ligação, atividades proteolíticas, atividades
15 de fosforilação/desfosforilação, atividades de oxidação-redução, atividades de transferência, atividades nucleolíticas, atividades de desidratação, atividades de indução de morte celular e atividades de indução de apoptose.

A presença da atividade antagonística pode ser determinada por
20 meio de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um composto de teste pode ser contatado com NR10 expressa sobre a superfície celular na presença de um ligante para determinar se a transdução de sinal intracelular que serve como um indicador para ativação de NR10 ocorre ou não. Essa determinação pode ser realizada, por exemplo, de acordo com o método descrito na referência "Dillon SR *et al.*, Interleukin 31, a
25 cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. Julho de 2004; 5(7):752-60". Compostos que inibem a sinalização intracelular que responde à estimulação de ligante são considerados como sendo antagonistas de NR10.

30 Os antagonistas da presente invenção podem ser compostos que ocorrem naturalmente ou artificiais. Antagonistas conhecidos podem ser usados na presente invenção. Também é possível usar novos compostos

que foram determinados como tendo uma atividade antagonística por meio dos métodos descritos acima.

Uma modalidade do antagonista de NR10 da presente invenção inclui anticorpos que se ligam à NR10. Tais anticorpos que se ligam à NR10
5 não estão particularmente limitados; contudo, anticorpos que se ligam especificamente à NR10 são preferidos. Uma modalidade preferida dos anticorpos que se ligam à NR10 inclui anticorpos tendo uma atividade de neutralização contra NR10. Na presente invenção, o "anticorpo tendo uma atividade de neutralização contra NR10" refere-se a um anticorpo tendo uma atividade
10 de supressão de uma atividade biológica baseada em NR10. Na presente invenção, "anticorpos tendo uma atividade de neutralização contra NR10" podem ser anticorpos policlonais ou monoclonais; contudo, em uma modalidade preferida, os anticorpos são anticorpos monoclonais.

Os anticorpos da presente invenção não estão particularmente
15 limitados, na medida em que eles se ligam à NR10 e incluem anticorpos recombinantes, tais como anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos humanos. Os anticorpos quiméricos contêm, por exemplo, as regiões constantes de cadeias longa e curta de um anticorpo humano e as regiões variáveis de cadeias longa e curta de um anticorpo de um mamífero
20 não humano, tal como camundongo. Os anticorpos quiméricos podem ser produzidos por meio de métodos conhecidos. Por exemplo, os anticorpos podem ser produzidos através de clonagem de um gene de anticorpo obtido de hibridomas, inserção do mesmo em um vetor apropriado e introdução do construto em hospedeiros (vide, por exemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James,
25 W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado no Reino Unido pela MACMILLAN PUBLISHERS LTDA., 1990). Especificamente, cDNAs das regiões variáveis (regiões V) do anticorpo são sintetizados a partir do mRNA de hibridomas usando transcriptase reversa. Uma vez que DNAs que codificam as regiões V de um anticorpo de interesse são obtidos,
30 esses são ligados com DNAs que codificam as regiões constantes (regiões C) de um anticorpo humano desejado. Os construtos resultantes são inseridos em vetores de expressão. Alternativamente, os DNAs que codificam as

regiões V do anticorpo podem ser inseridos em vetores de expressão compreendendo DNAs que codificam as regiões C de um anticorpo humano. Os DNAs são inseridos em vetores de expressão de modo que eles são expressos sob a regulação de regiões regulatórias de expressão, por exemplo, intensificadores e promotores. Na próxima etapa, células hospedeiras podem ser transformadas com os vetores de expressão para permitir expressão de anticorpos quiméricos.

Anticorpos humanizados são também referidos como anticorpos humanos reformatados e eles são preparados transferindo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo derivado de um mamífero não humano, tal como um camundongo, para as CDRs de um anticorpo humano. Técnicas de recombinação genética geral para seu preparo também são conhecidas. Especificamente, uma sequência de DNA criada de modo que as CDRs do anticorpo de camundongo sejam ligadas com as regiões de estrutura principal (FRs) do anticorpo humano é sintetizada por meio de PCR usando, como iniciadores, vários oligonucleotídeos que têm porções de sobreposição nas extremidades das CDRs e FRs. O DNA resultante é, então, ligado a um DNA que codifica uma região constante de anticorpo humano, inserido em um vetor de expressão e introduzido em um hospedeiro para produzir o anticorpo (vide Publicação de Pedido de Patente Européia No. EP 239400 e Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 96/02576). FRs a serem ligadas via CDRs são selecionadas de modo que as CDRs formem um sítio de ligação a antígeno favorável. Se necessário, aminoácidos nas regiões de estrutura principal da região variável de anticorpo podem ser substituídos, de modo que as CDRs do anticorpo humano reformatado formem um sítio de ligação a antígeno apropriado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Métodos para obtenção de anticorpos humanos são também conhecidos. Por exemplo, anticorpos humanos desejados com atividade de ligação a antígeno podem ser obtidos através de sensibilização de linfócitos humanos com antígenos de interesse ou células expressando antígenos de interesse *in vitro*; e fusão dos linfócitos sensibilizados com células de mielo-

ma humano, tal como U266 (vide Publicação de Pedido de Patente Japonesa Kokoku No. (JP-B) H01-59878 (Pedido de Patente Japonesa examinada, aprovado, publicado para oposição)). Alternativamente, o anticorpo humano desejado pode também ser obtido através de imunização de um animal transgênico tendo um repertório inteiro de genes de anticorpo humano com um antígeno desejado (vide Publicações de Pedido de Patente Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 e WO 96/33735).

Além disso, técnicas para obter anticorpos humanos por meio de "panning" com uma biblioteca de fago de anticorpo humano são conhecidas. Por exemplo, a região variável de um anticorpo humano é expressa como um anticorpo com uma única cadeia (scFv) sobre a superfície de um fago, usando um método de "phage display" e fagos que se ligam ao antígeno podem ser selecionados. Analisando os genes dos fagos selecionados, as sequências de DNA que codificam as regiões variáveis de anticorpos humanos que se ligam ao antígeno podem ser determinadas. Se as sequências de DNA de scFvs que se ligam ao antígeno são identificadas, vetores de expressão apropriados compreendendo essas sequências podem ser construídos para obter anticorpos humanos. Tais métodos são bem conhecidos. Referência pode ser feita aos documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388 e similares.

A sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou curta pode ter uma substituição, deleção, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou curta de um anticorpo cuja atividade de neutralização contra NR10 tenha sido confirmada. Métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica para preparar a sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou curta de um anticorpo tendo uma atividade de neutralização contra NR10 no qual um ou mais aminoácidos são substituídos, deletados, adicionados e/ou inseridos na sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou curta incluem métodos para introdução de mutações em

proteínas. Por exemplo, aqueles versados na técnica podem preparar mutantes funcionalmente equivalentes à região variável de cadeia longa ou curta do anticorpo tendo a atividade de neutralização contra NR10 por meio de introdução de mutações apropriadas na sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou curta do anticorpo tendo uma atividade de neutralização contra NR10 usando mutagênese sítio-dirigida (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y e Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ e Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M e Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W e Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492) ou similares. Assim, as regiões variáveis de cadeia longa ou curta de anticorpos que contêm uma ou mais mutações de aminoácido nas regiões variáveis de cadeia longa ou curta e têm uma atividade de neutralização contra NR10 são também incluídos nas regiões variáveis de cadeia longa ou curta da presente invenção.

Quando um resíduo de aminoácido é alterado, de preferência, o aminoácido sofre mutação para (um) aminoácido(s) diferente(s) que conserva as propriedades da cadeia lateral de aminoácido. Exemplos de propriedades de cadeia lateral de aminoácido são: aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y e V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S e T), aminoácidos contendo cadeias laterais alifáticas (G, A, V, L, I e P), aminoácidos contendo cadeias laterais contendo grupo hidroxila (S, T e Y), aminoácidos contendo cadeias laterais contendo enxofre (C e M), aminoácidos contendo cadeias laterais contendo ácido carboxílico e amida (D, N, E e Q), aminoácidos contendo cadeias laterais básicas (R, K e H) e aminoácidos contendo cadeias laterais aromáticas (H, F, Y e W) (aminoácidos são repre-

sentados pelos códigos de uma letra entre parênteses). Substituições de aminoácido dentro de cada grupo são denominadas substituições conservativas. Já se sabe que um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácido modificada na qual um ou mais resíduos de aminoácido em uma determinada sequência de aminoácido são deletados, adicionados e/ou substituídos por outros aminoácidos podem reter a atividade biológica original (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; (1984) 81: 5662-6; Zoller, M. J. e Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10: 6487-500; Wang, A. *et al.*, Science (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79: 6409-13). Tais mutantes têm uma identidade de aminoácido de pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% e, mais preferivelmente, pelo menos 95%, com as regiões variáveis de cadeia longa ou curta antes de mutações de aminoácido. Aqui, a identidade de sequência é definida como o percentual de resíduos idênticos àqueles na sequência de aminoácido original da região variável de cadeia longa ou região variável de cadeia curta, determinada após as sequências serem alinhadas e fendas serem apropriadamente introduzidas para maximizar a identidade de sequência, conforme necessário. A identidade de sequências de aminoácido pode ser determinada por meio do método descrito acima.

Alternativamente, as sequências de aminoácido de regiões variáveis de cadeia longa ou curta que têm a substituição, deleção, adição e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia longa ou curta e retêm a atividade de neutralização contra NR10 podem ser obtidas a partir de ácidos nucleicos que se hibridizam, sob condições estridentes, ao ácido nucleico composto da sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia longa ou curta. Condições de hibridização estridentes para isolar um ácido nucleico que se hibridiza, sob condições estridentes, a um ácido nucleico que inclui a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia longa ou curta incluem,

por exemplo, as condições de uréia a 6M, SDS a 0, 4%, 0, 5x SSC e 37°C ou condições de hibridização com estringências equivalentes às mesmas. Com condições mais estridentes, por exemplo, as condições de uréia a 6M, SDS a 0, 4%, 0, 1x SSC e 42°C, isolamento de ácidos nucleicos com uma

5 homologia muito maior pode ser esperado. As sequências dos ácidos nucleicos isolados podem ser determinadas por meio de métodos conhecidos descritos abaixo. A homologia global de sequência de nucleotídeo do ácido nucleico isolado é de pelo menos 50% ou mais de identidade de sequência, de preferência 70% ou maior, mais preferivelmente 90% ou maior (por exemplo,

10 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou maior).

Ácidos nucleicos que se hibridizam sob condições estridentes a um ácido nucleico composto da sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia longa ou curta podem também ser isolados usando, ao invés dos métodos descritos acima

15 utilizando técnicas de hibridização, métodos de amplificação gênica, tal como reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) usando iniciadores sintetizados baseado na informação da sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia longa ou curta.

20 Especificamente, a identidade de uma sequência de nucleotídeo ou sequência de aminoácido à outra pode ser determinada usando o algoritmo BLAST, por Karlin e Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 5873-7). Programas tais como o BLASTN e BLASTX foram desenvolvidos baseado nesse algoritmo (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-10).

25 Para analisar sequências de nucleotídeo de acordo com o BLASTN baseado no BLAST, os parâmetros são configurados, por exemplo, como score = 100 e extensão de palavra = 12. Por outro lado, parâmetros usados para análise de sequências de aminoácido pelo BLASTX baseado no BLAST incluem, por exemplo, score = 50 e extensão de palavra = 3. Os parâmetros

30 de default para cada programa são usados quando se utiliza os programas BLAST e Gapped BLAST. Técnicas específicas para tais análises são conhecidas no campo (vide o website do National Center for Biotechnology

Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Alternativamente, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos de baixo peso molecular. Os anticorpos de baixo peso molecular da presente invenção incluem anticorpos incluindo fragmentos de anticorpo carecendo de algumas porções de um anticorpo inteiro (por exemplo, IgG inteira) e não estão particularmente limitados, na medida em que eles retenham uma atividade de neutralização de NR10. Os anticorpos de baixo peso molecular da presente invenção não estão particularmente limitados, na medida em que eles contenham uma porção de anticorpos inteiros. Os anticorpos de baixo peso molecular contêm, de preferência, uma região variável de cadeia longa (VH) ou região variável de cadeia curta (VL). Anticorpos de baixo peso molecular particularmente preferidos contêm VH e VL. Além disso, exemplos preferidos dos anticorpos de baixo peso molecular da presente invenção incluem anticorpos de baixo peso molecular contendo CDRs de um anticorpo. As CDRs contidas nos anticorpos de baixo peso molecular podem incluir algumas ou todas as seis CDRs de um anticorpo.

Os anticorpos de baixo peso molecular da presente invenção têm, de preferência, um peso molecular menor do que aquele de anticorpos inteiros. Contudo, os anticorpos de baixo peso molecular podem formar multímeros, por exemplo, dímeros, trímeros ou tetrâmeros e, assim, seus pesos moleculares podem ser maiores do que aqueles de anticorpos inteiros.

Um exemplo os anticorpos de baixo peso molecular da presente invenção incluem anticorpos scFv. Anticorpos de scFv são polipeptídeos com uma única cadeia produzidos através de ligação de uma região variável de cadeia longa ([VH]) e uma região variável de cadeia curta ([VL]) via um ligante ou similares (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds., Resenbarg e Moore, Springer Verlag, New York, páginas 269-315, (1994)). A ordem das regiões variáveis de cadeia longa e cadeia curta a serem ligadas não está particularmente limitada e elas podem estar dispostas em qualquer ordem. Exemplos da disposição são listados abaixo:

[VH] ligante [VL]

[VL] ligante [VH]

A sequência de aminoácido da região variável de cadeia longa ou região variável de cadeia curta em um anticorpo de baixo peso molecular
 5 pode conter uma substituição, deleção, adição e/ou inserção. Além disso, a região variável de cadeia longa e região variável de cadeia curta podem também carecer de algumas porções ou terem a adição de outros polipeptídeos, na medida em que elas tenham a atividade de ligação a antígeno quando ligadas juntas. Alternativamente, as regiões variáveis podem ser
 10 quimerizadas ou humanizadas.

Na presente invenção, ligantes os quais se ligam às regiões variáveis do anticorpo incluem ligantes peptídicos arbitrários que podem ser introduzidos usando engenharia genética ou ligantes sintéticos, tais como aqueles divulgados em Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996.

15 Os ligantes preferidos na presente invenção são ligantes peptídicos. Os comprimentos dos ligantes peptídicos não estão particularmente limitados e aqueles versados na técnica podem selecionar apropriadamente os comprimentos, dependendo da finalidade. Comprimentos típicos são de um a 100 aminoácidos, de preferência 3 a 50 aminoácidos, mais preferivel-
 20 mente 5 a 30 aminoácidos e, particularmente de preferência, 12 a 18 aminoácidos (por exemplo, 15 aminoácidos).

Sequências de aminoácido de tais ligantes peptídicos incluem, por exemplo:

Ser;

25 Gly-Ser;

Gly-Gly-Ser;

Ser-Gly-Gly;

Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 8);

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 9);

30 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 10);

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 11);

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 12);

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 13);
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 14);
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 15);
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 10))_n; e
 5 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 11))_n,
 onde n é um número inteiro de 1 ou maior.

Ligantes sintéticos químicos (agentes de ligação cruzada químicos) incluem agentes de ligação cruzada que são rotineiramente usados em
 10 ligação cruzada de peptídeos, por exemplo, N-hidróxi succinimida (NHS),
 suberato de di-succinimidila (DSS), suberato de bis(sulfossuccinimidila)
 (BS³), propionato de ditiobis(succinimidila) (DSP), propionato de ditiobis(sulfossuccinimidila) (DTSSP), succinato de bis(succinimidila) de etileno glicol (EGS), succinato de bis(sulfossuccinimidila) de etileno glicol (sulfo-EGS), tartrato de dissuccinimidila (DST), tartrato de dissulfossuccinimidila
 15 (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxicarbonilóxi)etil] sulfona (BSOCOES) e bis[2-(sulfossuccinimidoxicarbonilóxi)etil] sulfona (sulfo-BSOCOES). Esses agentes de ligação cruzada estão comercialmente disponíveis.

Os anticorpos da presente invenção incluem anticorpos nos
 20 quais dois ou mais resíduos de aminoácido foram adicionados à sequência
 de aminoácido de um anticorpo da presente invenção. Ainda, proteínas de
 fusão as quais resultam de uma fusão entre um dos anticorpos acima e um
 peptídeo secundário ou proteína são incluídas na presente invenção. As proteínas de fusão podem ser preparadas através de ligação de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo da presente invenção e um polinucleotídeo
 25 que codifica um segundo peptídeo ou polipeptídeo "*in frame*", inserção desse em um vetor de expressão e expressão do construto de fusão em um hospedeiro. Algumas técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica estão disponíveis para essa finalidade. O peptídeo ou polipeptídeo parceiro a ser fundido com um anticorpo da presente invenção pode ser um peptídeo
 30 conhecido, por exemplo, FLAG (Hopp, T. P. *et al.*, BioTechnology 6, 1204-1210 (1988)), 6x His consistindo em seis resíduos de His (histidina), 10x His, hemaglutinina de influenza (HA), fragmento c-myc humano, fragmento VSV-

GP, fragmento p18HIV, T7-tag, HSV-tag, E-tag, fragmento de antigênico T de SV40, Ick tag, fragmento de α -tubulina, B-tag e fragmento de Proteína C. Outros polipeptídeos de fusão a serem fundidos com os anticorpos da presente invenção incluem, por exemplo, GST (glutathione-S-transferase), HA (hemaglutinina de influenza), região constante de imunoglobulina, β -galactosidase e MBP (proteína de ligação à maltose). Um polinucleotídeo que codifica um desses peptídeos ou polipeptídeos comercialmente disponíveis pode ser fundido com um polinucleotídeo que codifica um anticorpo da presente invenção. O polipeptídeo de fusão pode ser preparado mediante expressão do construto de fusão.

Além disso, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos conjugados os quais são ligados a qualquer uma de várias moléculas, incluindo substâncias poliméricas, tais como polietileno glicol (PEG), ácido hialurônico, substâncias radioativas, substâncias fluorescentes, substâncias luminescentes, enzimas e toxinas. Tais anticorpos conjugados podem ser obtidos mediante modificação química dos anticorpos obtidos. Métodos para modificação de anticorpos foram estabelecidos nesse campo (por exemplo, US 5057313 e US 5156840). Os "anticorpos" da presente invenção também incluem tais anticorpos conjugados.

Além disso, uma modalidade preferida dos anticorpos anti-NR10 na presente invenção inclui, sem limitação particular, anticorpos que reconhecem o domínio 1. Na presente invenção, domínio 1 refere-se à região de aminoácidos nas posições 21 a 120 (LPAKP a LENIA) na sequência de aminoácido da NR10 humana de SEQ ID NO: 7, onde a numeração de aminoácido é baseada na sequência incluindo o peptídeo sinalizador.

Os anticorpos da presente invenção podem diferir quanto à sequência de aminoácido, peso molecular, ponto isoelétrico, presença/ausência de cadeias de açúcar e conformação, dependendo da célula ou hospedeiro que produz o anticorpo ou do método de purificação, conforme descrito abaixo. Contudo, um anticorpo resultante é incluído na presente invenção, na medida em que ele tenha uma função como um antagonista de NR10. Por exemplo, quando um anticorpo da presente invenção é expresso

em células procariotas, por exemplo, *E. coli*, um resíduo de metionina é adicionado ao Terminal N da sequência de aminoácido do anticorpo original. Tais anticorpos são incluídos na presente invenção.

Anticorpos monoclonais tendo uma atividade de neutralização
5 contra NR10 podem ser obtidos, por exemplo, por meio do procedimento a seguir: anticorpos monoclonais anti-NR10 são preparados usando, como um antígeno, NR10 ou um fragmento da mesma que é derivado de um mamífero, tal como um ser humano ou camundongo, através de métodos conhecidos e, então, anticorpos tendo uma atividade de neutralização contra NR10
10 são selecionados dos anticorpos monoclonais anti-NR10 assim obtidos. Especificamente, um antígeno desejado ou células expressando o antígeno desejado são usadas como um antígeno de sensibilização para imunização de acordo com métodos de imunização convencionais. Anticorpos monoclonais anti-NR10 podem ser preparados fundindo as células imunes obtidas
15 com células parentais conhecidas usando métodos de fusão celular convencionais e varredura dos mesmos quanto às células que produzem anticorpo monoclonal (hibridomas) através de métodos de varredura convencionais. Animais a serem imunizados incluem, por exemplo, mamíferos, tais como camundongos, ratos, coelhos, ovelha, macacos, cabras, burros, vacas, cavalos e porcos. O antígeno pode ser preparado usando a sequência do gene de NR10 conhecida de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, através de métodos usando baculovírus (por exemplo, WO 98/46777).

Hibridomas podem ser preparados, por exemplo, de acordo com o método de Milstein *et al.* (Kohler, G. e Milstein, C., *Methods Enzymol.*
25 (1981) 73: 3-46) ou similares. Quando a imunogenicidade de um antígeno é baixa, imunização pode ser realizada após ligação do antígeno com uma macromolécula tendo imunogenicidade, tal como albumina.

Modalidades dos anticorpos da presente invenção que têm uma atividade de neutralização contra NR10 incluem anticorpos monoclonais que
30 têm uma atividade de neutralização contra NR10 humana. Antígenos usados para preparar anticorpos monoclonais que têm uma atividade de neutralização contra NR10 humana não estão particularmente limitados, na medida

em que eles sejam capazes de preparar anticorpos que têm uma atividade de neutralização contra NR10 humana. Por exemplo, sabe-se que existe uma série de variantes de NR10 humana e qualquer variante pode ser usada como um imunogênio, na medida em que ela permita o preparo de anticorpos que têm uma atividade de neutralização contra NR10 humana. Alternativamente, sob a mesma condição, um fragmento peptídico de NR10 ou uma proteína na qual mutações artificiais tenham sido introduzidas na sequência da NR10 natural podem ser usados como um imunogênio. NR10.3 humana é um dos imunogênios preferidos no preparo de anticorpos que têm uma atividade de neutralização de NR10 na presente invenção.

Além disso, a atividade de neutralização de anticorpo contra NR10 pode ser medida, por exemplo, observando o efeito de supressão do crescimento da linhagem de célula dependente de IL-31 conforme descrito nos Exemplos de Referência.

Entretanto, anticorpos monoclonais podem também ser obtidos mediante imunização de DNA. Imunização de DNA é um método no qual um DNA de vetor construído de modo que o gene que codifica uma proteína antigênica pode ser expressa em um animal a ser imunizado é administrado ao animal e o imunogênio é expresso dentro do corpo do animal para proporcionar imunoestimulação. Quando comparado com métodos de imunização comuns baseados na administração de antígenos de proteína, espera-se que a imunização de DNA seja vantajosa pelo fato de que:

- ela permite imunoestimulação, ao mesmo tempo em que retém a estrutura de uma proteína da membrana; e
- o imunogênio não precisa ser purificado.

Por outro lado, é difícil combinar imunização de DNA com um meio de imunoestimulação, tal como um adjuvante.

De forma a obter um anticorpo monoclonal mediante imunização de DNA, primeiro, DNA que codifica NR10 é administrado a um animal a ser imunizado. O DNA que codifica NR10 pode ser sintetizado por meio de métodos conhecidos, tal como PCR. O DNA resultante é inserido em um vetor de expressão apropriado e administrado ao animal a ser imunizado. Vetores

de expressão que podem ser usados incluem vetores de expressão comercialmente disponíveis, tal como pcDNA3.1. O vetor pode ser administrado ao corpo vivo por meio de métodos convencionais. Por exemplo, imunização de DNA pode ser realizada mediante introdução de partículas de ouro revestidas com o vetor de expressão em células através de uma pistola gênica. Reforço usando células que expressam NR10 após imunização com DNA é um método preferido para proporcionar um anticorpo monoclonal.

Uma vez que o mamífero é imunizado conforme descrito acima e o nível no soro de um anticorpo desejado é confirmado como estando aumentado, células imunes são coletadas do mamífero e submetidas à fusão celular. Células imunes preferidas são células de baço em particular.

Células de mieloma de mamífero são usadas para fusão com as células imunes acima. É preferido que as células de mieloma tenham marcadores de seleção apropriados para varredura. O marcador de seleção refere-se a um fenótipo que permite (ou não permite) sobrevivência sob condições de cultura particulares. Marcadores de seleção conhecidos incluem deficiência de fosforibosiltransferase de hipoxantina-guanina (aqui depois abreviada como "deficiência de HGPRT") e deficiência de cinase de timidina (aqui depois abreviada como "deficiência de TK"). Células deficientes de HGPRT ou TK exibem sensibilidade à hipoxantina-aminopterina-timidina (aqui depois abreviada como "sensibilidade a HAT"). Em meio de seleção HAT, células sensíveis a HAT não podem sintetizar DNA e, assim, morrerão. Contudo, quando fundidas com células normais, elas podem continuar a sintetizar DNA através da via de salvamento das células normais e, assim, podem crescer mesmo em meio de seleção HAT.

Células deficientes em HGPRT ou TK podem ser selecionadas usando um meio contendo 6-tioguanina, 8-azaguanina (aqui depois abreviado como "8AG") ou 5'-bromodeoxiuridina. Enquanto células normais são mortas em virtude da incorporação desses análogos de pirimidina no DNA, células carecendo dessas enzimas podem sobreviver no meio de seleção porque elas não podem incorporar esses análogos de pirimidina. Outro marcador de seleção denominado G418 confere resistência a antibióticos de 2-

deoxiestreptamina (análogos de gentamicina) em virtude do gene de resistência à neomicina. Várias células de mieloma adequadas para fusão celular são conhecidas.

5 Fusão celular entre células imunes e células de mieloma pode ser realizada essencialmente de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, o método de Kohler e Milstein (Kohler, G. e Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46).

10 Mais especificamente, fusão celular pode ser realizada, por exemplo, em um meio de cultura comum na presença de um agente de promoção de fusão celular. O agente de promoção de fusão inclui, por exemplo, polietileno glicol (PEG) e Sendai vírus (HVJ). Se requerido, um agente auxiliar, tal como sulfóxido de dimetila, pode também ser adicionado para aprimorar a eficiência de fusão.

15 As células imunes e células de mieloma podem ser usadas em uma proporção arbitrariamente determinada. Por exemplo, a proporção de células imunes para células de mieloma é, de preferência, de 1 para 10. Meios de cultura a serem usados para fusão celular incluem, por exemplo, meios que são adequados para o crescimento celular da linhagem de célula de mieloma, tais como RPMI 1640 e MEM e outros meios de cultura comuns
20 usados para esse tipo de cultura de célula. Além disso, os meios de cultura podem também ser suplementados com suplemento de soro, tal como soro fetal de bezerro (FCS).

Quantidades predeterminadas de células imunes e células de mieloma são bem misturadas no meio de cultura e, então, misturadas com
25 uma solução de PEG pré-aquecida para 37 °C a fim de produzir células fundidas (hibridomas). No método de fusão celular, por exemplo, PEG com um peso molecular de cerca de 1.000-6.000 pode ser adicionado às células, tipicamente em uma concentração de 30% a 60% (peso/v). Então, adição sucessiva do meio de cultura apropriado listado acima e remoção do sobrenadante mediante centrifugação são repetidas para eliminar o agente de fusão
30 celular e similares, os quais são desfavoráveis para o crescimento de hibridomas.

Os hibridomas resultantes podem sofrer varredura usando um meio de seleção de acordo com o marcador de seleção possuído pelas células de mieloma usadas na fusão celular. Por exemplo, células deficientes em HGPRT ou TK podem sofrer varredura através de cultura das mesmas em um meio HAT (um meio contendo hipoxantina, aminopterin e timidina). Especificamente, quando células de mieloma sensíveis ao HAT são usadas em fusão celular, células fundidas com sucesso às células normais podem ser seletivamente crescidas em meio HAT. A cultura de célula usando o meio HAT acima é continuada durante um período de tempo suficiente para permitir que todas as células, exceto os hibridomas desejados (células não fundidas) morram. Especificamente, em geral, os hibridomas desejados podem ser selecionados através de cultura das células durante vários dias a várias semanas. Então, varredura e clonagem única de hibridomas que produzem um anticorpo de interesse podem ser realizadas procedendo a métodos de diluição limitativa comuns. Alternativamente, anticorpos que reconhecem a NR10 podem ser preparados por meio do método descrito no WO 03/104453.

Varredura e clonagem única de um anticorpo de interesse podem ser adequadamente realizadas por meio de métodos de varredura conhecidos baseado em reação antígeno-anticorpo. Por exemplo, um antígeno é ligado a um veículo, tal como glóbulos feitos de poliestireno ou similares e lâminas de microtitulação com 96 poços comercialmente disponíveis e, então, reagidos com o sobrenadante de cultura de hibridoma. Em seguida, o veículo é lavado e, então, reagido com o anticorpo secundário rotulado com enzima ou similares. Quando o sobrenadante de cultura contém um anticorpo de interesse reativo ao antígeno de sensibilização, o anticorpo secundário se liga ao veículo via esse anticorpo. Finalmente, o anticorpo secundário ligado ao veículo é detectado para determinar se o sobrenadante de cultura contém o anticorpo de interesse. Hibridomas que produzem um anticorpo desejado capaz de ligação ao antígeno podem ser clonados por meio do método de diluição limitativa ou similares. Não apenas o antígeno usado para imunização, mas também uma proteína NR10 subsequentemente equiva-

lente ao mesmo pode, de preferência, ser usada como um antígeno para essa finalidade. Por exemplo, uma linhagem de célula expressando NR10, o domínio extracelular de NR10 ou um oligopeptídeo composto de uma sequência de aminoácido parcial que constitui o domínio podem ser usados
5 como o antígeno.

Além do método descrito acima para preparo de hibridomas através de imunização de um animal não-humano com um antígeno, anticorpos de interesse podem também ser obtidos por meio de sensibilização de linfócitos humanos com um antígeno. Especificamente, primeiro, linfócitos
10 humanos são sensibilizados com proteína NR10 *in vitro*. Então, os linfócitos sensibilizados são fundidos com um parceiro de fusão apropriado. Por exemplo, células de mieloma derivadas de ser humano com a capacidade de se dividir permanentemente podem ser usadas como o parceiro de fusão (vide Publicação de Pedido de Patente Japonesa Kokoku No. (JP-B) H1-
15 59878 (pedido de patente Japonesa examinado, aprovado, publicado para oposição). Anticorpos obtidos por meio desse método são anticorpos humanos tendo uma atividade de ligação à proteína NR10.

Os anticorpos obtidos através do método descrito acima podem ser produzidos por meio de métodos conhecidos por aqueles versados na
20 técnica. Por exemplo, baseado na sequência do anticorpo que reconhece NR10, o anticorpo pode ser produzido por meio de técnicas de recombinação genética conhecidas por aqueles versados na técnica. Especificamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo pode ser construído baseado na sequência do anticorpo que reconhece NR10, inserido em um vetor de
25 expressão e, então, expresso em células hospedeiras apropriadas (vide, por exemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. e Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. e Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986)
30 121, 663-669; Bird, R. E. e Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Os vetores incluem vetores M13, vetores pUC, pBR322, pBlues-

cript e pCR-Script. Alternativamente, quando se objetiva subclonar e excisar cDNA, os vetores incluem, por exemplo, pGEM-T, pDIRECT e pT7, além dos vetores descritos acima. Vetores de expressão são particularmente úteis quando usando vetores para a produção dos anticorpos da presente inven-

5 ção. Por exemplo, quando se objetiva expressão em *E. Coli*, tal como JM109, DH5 α , HB101 e XL1-Blue, os vetores de expressão não apenas têm as características descritas acima que permitem amplificação do vetor em *E. coli*, mas também devem trazer um promotor que permite expressão eficiente em *E. coli*, por exemplo, promotor lacZ (Ward *et al.*, Nature (1989) 341,

10 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), promotor araB (Better *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043), promotor T7 ou similares. Tais vetores incluem pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress System" (Qiagen), pEGFP ou pET (nesse caso, o hospedeiro é, de preferência, BL21 que expressa RNA polimerase T7), além dos vetores descritos acima.

15 Os vetores podem conter sequências sinalizadoras para secreção de anticorpo. Como uma sequência sinalizadora para secreção de anticorpo, uma sequência sinalizadora pelB (Lei, S. P. *et al* J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) pode ser usada quando a proteína é secretada no periplasma de *E. coli*. O vetor pode ser introduzido em células hospedeiras por meio dos

20 métodos com cloreto de cálcio ou eletroporação, por exemplo.

Além de vetores para *E. coli*, os vetores para produção dos anticorpos da presente invenção incluem vetores de expressão de mamífero (por exemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), página 5322), pEF e pCDM8), vetores de expressão derivados de

25 célula de inseto (por exemplo, o "sistema de expressão de baculovírus Bacto-BAC" (Gibco-BRL) e pBacPAK8), vetores de expressão derivados de planta (por exemplo, pMH1 e pMH2), vetores de expressão derivados de vírus animal (por exemplo, pHSV, pMV e pAdexLcw), vetores de expressão retrovirais (por exemplo, pZIPneo), vetores de expressão de levedo (por exemplo, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11 e SP-Q01) e vetores de

30 expressão de *Bacillus subtilis* (por exemplo, pPL608 e pKTH50), por exemplo.

Quando objetivando expressão em células animais, tais como células CHO, COS e NIH3T, os vetores devem ter um promotor essencial para expressão em células, por exemplo, promotor SV40 (Mulligan *et al.*, Nature (1979) 277, 108), promotor MMLV-LTR, promotor EF1 α (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) e promotor de CMV e, mais preferivelmente, eles têm um gene para seleção de células transformadas (por exemplo, um gene de resistência a fármaco que permite avaliação usando um agente (neomicina, G418 ou similares). Vetores com tais características incluem pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV e pOP13, por exemplo.

Além disso, o método a seguir pode ser usado para expressão de gene estável e amplificação gênica em células: células CHO deficientes em uma via de síntese de ácido nucleico são introduzidas com um vetor (por exemplo, pSV2-dhfr (Molecular Cloning 2^a edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)) que traz um gene de DHFR o qual compensa a deficiência e o vetor é amplificado usando metotrexato (MTX). Alternativamente, o método a seguir pode ser usado para expressão gênica transitória: células COS com um gene expressando antígeno SV40 T sobre seu cromossomo são transformadas com um vetor (pcD e similares) com uma origem de replicação de SV40. Origens de replicação derivadas do poliovírus, adenovírus, papiloma vírus bovino (BPV) e similares também podem ser usadas. Para amplificar o número de cópias do gene em células hospedeiras, os vetores de expressão podem ainda trazer marcadores de seleção, tais como o gene de transferase de aminoglicosídeo (APH), o gene de cinase de timidina (TK), o gene de fosforibosil transferase de xantina-guanina de *E. coli* (E-cogpt) e o gene de reductase de di-hidrofolato (dhfr).

Os anticorpos da presente invenção obtidos por meio dos métodos descritos acima podem ser isolados de dentro das células hospedeiras ou de fora das células (do meio ou similares) e purificados até homogeneidade. Os anticorpos podem ser isolados e purificados por meio de métodos rotineiramente usados para isolamento e purificação de anticorpos e o tipo de método não está limitado. Por exemplo, os anticorpos podem ser isolados

e purificados selecionando e combinando apropriadamente cromatografia em coluna, filtração, ultrafiltração, dessalinização, precipitação de solvente, extração de solvente, destilação, imunoprecipitação, SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida, isoeletrofocalização, diálise, recristalização e similares.

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

- A atividade de ligação à NR10 dos anticorpos pode ser determinada por meio de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Métodos para determinação da atividade de ligação a antígeno de um anticorpo
- 20 incluem, por exemplo, ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), EIA (imunoensaio enzimático), RIA (radioimunoensaio) e o método de anticorpo fluorescente. Por exemplo, quando um imunoensaio enzimático é usado, amostras contendo anticorpo, tal como anticorpos purificados e sobrenadantes de cultura de células que produzem anticorpo, são adicionadas à lâminas
- 25 revestidas de antígeno. Um anticorpo secundário rotulado com uma enzima, tal como fosfatase alcalina, é adicionado e as lâminas são incubadas. Após lavagem, um substrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenila, é adicionado e a absorbância é medida para avaliar a atividade de ligação a antígeno.

- 30 Além disso, a atividade de neutralização de um anticorpo contra NR10 pode ser determinada, por exemplo, por meio do método descrito nos Exemplos de Referência, nos quais o efeito de inibição de crescimento sobre

a linhagem de célula dependente de IL-31 é observado.

Os antagonistas de NR10 ou anticorpos tendo atividade de neutralização contra NR10 na presente invenção podem ser usados como agentes conservantes ou terapêuticos para prurido. Os presentes inventores ad-

5 ministraram anticorpos tendo uma atividade de neutralização contra NR10 de camundongo a animais modelos de prurido e demonstraram que os anticorpos produziram um efeito terapêutico acentuado. Além disso, também se espera que antagonistas de NR10 de não anticorpo tenham um efeito terapêutico contra prurido, conforme observado nos Exemplos.

10 Os presentes inventores descobriram que anticorpos antagonísticos contra NR10 tinham um efeito terapêutico sobre prurido. Por outro lado, foi revelado que, no modelo de dermatite aguda de contato e no modelo de colite aguda DSS, anticorpos antagonísticos anti-NR10 não tinham efeito terapêutico contra essas doenças em si.

15 Na presente invenção, o tratamento de prurido se distingue do tratamento de doenças e sintomas que causam prurido (por exemplo, as doenças descritas abaixo, tais como dermatite atópica e hepatite do tipo C). Portanto, os agentes terapêuticos ou conservantes da presente invenção para prurido objetivam o prurido em si e eles não são para o tratamento ou

20 prevenção de doenças ou sintomas que causam prurido. Os agentes conservantes ou terapêuticos da presente invenção são administrados aos pacientes que precisam de tratamento ou prevenção de prurido para fins de tratamento ou prevenção de prurido, mas não para fins de tratamento ou prevenção de doenças e sintomas que causam prurido.

25 Prurido a ser tratado pela presente invenção não está particularmente limitado e pode ser qualquer tipo de prurido. Exemplos específicos de prurido a serem tratados pela presente invenção incluem, por exemplo, prurido em sarnas, pediculação, picadas e mordidas de besouro, urticária, dermatite atópica, dermatite de contato, líquen plano, miliária, dermatite her-

30 petiforme, xeroderma, obstrução biliar, cirrose biliar primária (PBC), hepatite infecciosa, tal como hepatite do tipo C, urinemia, insuficiência renal crônica, diálise renal, linfoma, leucemia, policitemia rubra vera, gravidez, ingestão de

fármacos (barbitúricos, salicilato, etc.), hipertiroidismo, diabetes mellitus e cânceres de órgãos.

Os agentes conservantes ou terapêuticos da presente invenção para prurido compreendem, como um ingrediente ativo, o antagonista de NR10 ou anticorpo tendo uma atividade de neutralização contra NR10 descrito acima. A frase "compreendem um antagonista de NR10 como um ingrediente ativo" significa contendo um antagonista de NR10 como pelo menos um ingrediente ativo e não limita o teor do antagonista de NR10. Os agentes conservantes ou terapêuticos da presente invenção para prurido podem conter outros ingredientes que promovem a prevenção ou tratamento de prurido, em combinação com o antagonista de NR10.

Prurido para o qual os agentes terapêuticos ou conservantes da presente invenção são usados não está particularmente limitado e pode ser desenvolvido por qualquer causa; contudo, prurido preferido é prurido envolvendo IL-31. Tal prurido envolvendo IL-31 inclui prurido causado por IL-31 e prurido com alta expressão de IL-31.

Os antagonistas NR10 da presente invenção podem ser preparados como formulações de acordo com métodos-padrão (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edição, Mark Publishing Company, Easton, EUA). Ainda, eles podem conter veículos e/ou aditivos farmacologicamente aceitáveis, se necessário. Por exemplo, eles podem conter tensoativos (por exemplo, PEG e Tween), excipientes, antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico), agentes de coloração, agentes de flavorização, conservantes, estabilizantes, agentes de tamponamento (por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico e outros ácidos orgânicos), agentes de quelação (por exemplo, EDTA), agentes de suspensão, agentes de isotonização, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes, promotores e corretores de fluidez. Contudo, sem limitação aos mesmos, os agentes para prevenção ou tratamento de doenças inflamatórias da presente invenção podem conter outros veículos comumente usados. Tais veículos incluem, especificamente, ácido silícico anidro leve, lactose, celulose cristalina, manitol, amido, carmelose de sódio, carmelose de cálcio, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, polivini-

lacetaldietilaminoacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicerídeo de ácido graxo de cadeia média, polioxietileno de óleo de mamona hidrogenado 60, sacarose, carboximetilcelulose, amido de milho e sal inorgânico. Os agentes podem também conter outros polipeptídeos de baixo peso molecular, proteínas tais como albumina de soro, gelatina e imunoglobulina e aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina e lisina. Quando o antagonista de NR10 é preparado como uma solução aquosa para injeção, o antagonista de NR10 pode ser dissolvido em uma solução isotônica contendo, por exemplo, solução salina fisiológica, dextrose ou outros adjuvantes. Os adjuvantes podem incluir, por exemplo, D-sorbitol, D-manose, D-manitol e cloreto de sódio. Além disso, agentes de solubilização apropriados, por exemplo, álcoois (por exemplo, etanol), poliálcoois (por exemplo, propileno glicóis e PEG) e detergentes não iônicos (polissorbato 80 e HCO-50) podem ser usados concomitantemente.

Se necessário, antagonistas de NR10 podem ser encapsulados em micropartículas (micropartículas podem ser feitas de hidroximetilcelulose, gelatina, polimetilmetacrilato e similares) e transformados em componentes de sistemas de distribuição de fármaco coloidais (lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) (por exemplo, vide "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edição" &, Oslo Ed. (1980)). Além disso, métodos para fabricação de fármacos com liberação sustentada são conhecidos e esses podem ser aplicados para antagonistas de NR10 (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; Patente US No. 3.773.919; Pedido de Patente Européia (EP) No. 58, 481; Sidman *et al.*, Biopolymers (1983) 22, 547-56; EP 133.988).

Os agentes para prevenção ou tratamento de prurido da presente invenção podem ser administrados oral ou parenteralmente mas, de preferência, são administrados parenteralmente. Especificamente, os agentes são administrados aos pacientes por meio de injeção ou administração percutânea. Injeções incluem, por exemplo, injeções intravenosas, injeções intramusculares e injeções subcutâneas, para administração sistêmica ou local.

Os agentes podem ser fornecidos a locais onde inflamação tem de ser suprimida ou áreas que envolvem os locais através de infusão local, injeção intramuscular em particular. Os métodos de administração podem ser apropriadamente selecionados de acordo com a idade e condição do paciente. A dose para uma única administração pode ser selecionada, por exemplo, da faixa de 0, 0001 a 100 mg do ingrediente ativo por kg de peso corporal. Alternativamente, por exemplo, quando os agentes são administrados a pacientes humanos, a dose do ingrediente ativo pode ser selecionada da faixa de 0, 001 a 1.000 mg/kg de peso corporal. A dose para uma única administração contém, de preferência, por exemplo, cerca de 0, 01 a 50 mg/kg de peso corporal de um antagonista de NR10. Contudo, a dose de um agente para prevenção ou tratamento de prurido da presente invenção não está limitada a esses exemplos.

A presente invenção também proporciona agentes terapêuticos para prurido os quais compreendem um antagonista de IL-31 como um agente ativo. Tais antagonistas de IL-31 não estão particularmente limitados, na medida em que eles sejam substâncias que inibem a atividade biológica de IL-31 através de ligação à IL-31. Antagonistas de IL-31 preferidos incluem, por exemplo, anticorpos anti-IL-31 (por exemplo, WO 2006/088955, WO 2006/88956 e WO 2006/122079). O preparo, alteração, modificação, produção, purificação, administração, formulação e similares de anticorpos anti-IL-31 podem ser feitos de acordo com a descrição acima com relação aos anticorpos anti-NR10.

Todos os documentos da técnica anterior citados na presente especificação são incorporados aqui por referência.

Exemplos

Aqui abaixo, a presente invenção é especificamente descrita usando Exemplos, mas ela não deve ser construída como estando limitada aos mesmos.

30 Exemplo 1

Avaliação de comportamento de se coçar induzido por IL-31

Dez µg de IL-31 de camundongo ("in house") foram intraveno-

samente administrados a camundongos BALB/c fêmeas normais de 9 semanas de idade (Charles River Laboratories, Japão). O comportamento de se coçar foi monitorado e analisado durante 12 horas imediatamente após a administração usando um sistema de contagem de coceira (MicroAct; NeuroScience Inc.). Como um resultado, o grupo administrado com IL-31 (n = 8) mostrou um aumento significativo no número de coceiras com um pico em torno de cinco horas após a administração, quando comparado com o grupo administrado com um veículo (PBS contendo soro de camundongo BALB/c a 0, 5%) (n = 8). Esse comportamento de se coçar induzido por IL-31 foi completamente suprimido por meio da administração intravenosa de 350 mg/kg de BM095, um anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo, antes de administração de IL-31 (n = 8) (figura 1). Esse resultado demonstra que o anticorpo de neutralização anti-NR10 tem um efeito de supressão do prurido induzido por IL-31.

15 Efeito do anticorpo de neutralização anti-NR10 no modelo de dermatite induzida por antígeno de ácaro

Cinco µg de extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) (Cosmo Bio LSL) foram administrados como um antígeno de ácaro intradermicamente a camundongos NC/Nga Tnd Crlj fêmeas SPF de 9 semanas de idade (Charles River Laboratories, Japão) no lado ventral de suas orelhas três vezes por semana durante três semanas para induzir à dermatite (Int Arch Allergy Immunol 2004; 133: 55-63). No grupo de controle com solvente para Dp, 5 µl de solução salina normal (Otsuka Pharmaceutical Co.) foram administrados no mesmo esquema (n = 7). Nesse modelo patológico, o anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo BM-095 foi intravenosamente administrado a 20 mg/kg nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17 e 21 (n = 8). Para um grupo de controle com veículo, tampão de NaCl a 200 mmol/L/acetato de sódio a 20 mmol/L (pH 5, 5) foi intravenosamente administrado sob o mesmo esquema (n = 8).

30 O prurido foi avaliado através de contagem do número de coceiras durante o tempo de medição de 12 horas no dia 21 usando um sistema de contagem de coceira (MicroAct; NeuroScience Inc.). O resultado mostrou

que o número de coceiras era significativamente aumentado no grupo de controle com veículo quando comparado com o grupo de controle com solvente para Dp ($p < 0,005$). No grupo administrado com BM095, o número de coceiras foi significativamente reduzido quando comparado com o grupo de controle com veículo ($p < 0,05$) (figura 2).

Esse resultado demonstra que o anticorpo de neutralização anti-NR10 tem um efeito de supressão contra prurido.

Exemplo 2

Efeito de supressão de H0L0 contra prurido induzido por IL-31 em macacos cynomolgus

O efeito do anticorpo anti-NR10 humana H0L0 (sequência de aminoácido de cadeia longa/SEQ ID NO: 17; sequência de aminoácido de cadeia curta/SEQ ID NO: 18) sobre o prurido induzido através de administração intravenosa de IL-31 de macaco cynomolgus a macacos cynomolgus de 4 a 5 anos de idade foi examinado. PBS (veículo) ou H0L0 foi intravenosamente administrado a 0,01, 0,03, 0,06, 0,3 e 0,6 mg/kg. Vinte e quatro horas após administração intravenosa, 1 g/kg de IL-31 de macaco cynomolgus foi intravenosamente administrado e, então, o comportamento foi registrado com uma câmera de vídeo durante duas horas. O número de coceiras foi contado enquanto se revia o vídeo gravado, admitindo três ou mais ações consecutivas de se coçar como uma coceira. O resultado mostrou que H0L0 reduziu o número de coceiras induzidas por IL-31 de macaco cynomolgus de uma maneira dependente da dose (figura 5). Esse resultado demonstra que o anticorpo anti-NR10 H0L0 tem um efeito de supressão contra prurido.

Exemplo de Referência 1

Estabelecimento de linhagens de célula Ba/F3 expressando NR10 e OSMR

O cDNA de NR10 humana (WO 00/75314, SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 16) foi inserido no vetor de expressão pCOS1 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, páginas 838-45, 1996) e o vetor resultante foi denominado pCosNR10.3. Um cDNA do receptor de oncostatina M (OSMR, Acesso ao GenBank No. NM003999) foi isolado por meio de PCR de uma biblioteca placentária humana e o vetor de expressão pCos1-hOSMR foi construído da

mesma maneira. 10 µg de cada um dos vetores foram simultaneamente introduzidos na linhagem de célula derivada de célula pró-B IL-3 dependente de camundongo Ba/F3 por meio de eletroporação (BioRad Gene Pulser, 960 µF, 0, 33 kV). Após introdução, IL-31 humana foi adicionada e as células foram cultivadas para obter uma linhagem de célula que prolifera de uma maneira dependente de IL-31. Da mesma maneira, uma linhagem de célula dependente de IL-31 de camundongo foi também produzida a partir de células Ba/F3 expressando os genes de NR10 de camundongo e OSMR de camundongo.

10 Ambas as linhagens de célula exibiram uma ED50 de vários ng/ml e proliferaram bem. A linhagem de célula dependente de IL-31 humana não responde à IL-31 de camundongo e foi suprimida pela adição de proteína NR10 humana (domínio extracelular). Entretanto, a linhagem de célula dependente de IL-31 de camundongo não responde à IL-31 humana e não
15 foi suprimida pela adição de proteína NR10 de camundongo (domínio extracelular).

Exemplo de Referência 2

Preparo de proteína NR10 (domínio extracelular)

O cDNA de NR10 humana foi usado como um modelo para amplificar apenas o domínio extracelular por meio de PCR. A região amplificada foi, então, presa a uma sequência de tag FLAG no terminal C e inserida no vetor de expressão pCXND3 (WO2005/005636) (pCXND3-NR10-flag). Dez µg do vetor linearizado foram introduzidos na linhagem de célula de ovário de hamster Chinês DG44 por meio de eletroporação (BioRad Gene PulserII, 25 µF, 1, 5 kV). Uma linhagem de célula que mostra expressão em alto nível foi obtida. O sobrenadante da linhagem de célula cultivada em larga escala foi purificado usando uma coluna antianticorpo FLAG (Sigma) e filtração em gel para obter uma amostra purificada, a qual foi submetida aos experimentos descritos abaixo. NR10 de camundongo (domínio extracelular) no qual
25
30 uma sequência de tag FLAG tinha sido adicionada no terminal C também foi produzida da mesma maneira.

Exemplo de Referência 3

Isolamento de scFv tendo atividade de neutralização anti-NR10 de camundongo e preparo de IgG BM095 quimérica

Clones candidatos sofreram varredura a partir de uma biblioteca de fago humana por meio do método de "*panning*" usando proteína NR10 de camundongo biotinilada (domínio extracelular). scFvs secretórios foram purificados desse clones e adicionados ao sistema de ensaio de crescimento de células Ba/F3 dependente de IL-31 descrito no Exemplo de Referência 1. Como um resultado, um clone exibindo uma forte atividade de supressão, BM095, foi obtido com sucesso.

As sequências da região variável de cadeia H humana (VH) e região variável de cadeia curta (VL) do BM095 foram ligadas à região constante de IgG2a de camundongo (após o CH1) e a região constante de cadeia λ , respectivamente, através de PCR para construir um vetor de expressão. Essa sequência de aminoácido de VH é mostrada em SEQ ID NO: 1 e a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido é mostrada em SEQ ID NO: 2. A sequência de aminoácido da VL é mostrada em SEQ ID NO: 3 e a sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido é mostrada em SEQ ID NO: 4. Os respectivos vetores de expressão linearizados foram simultaneamente introduzidos em células DG44 e uma linhagem de célula expressando a IgG quimérica em um alto nível foi selecionada. Uma amostra purificada foi obtida do sobrenadante de uma cultura em larga escala dessa linhagem de célula através de cromatografia em coluna de Proteína A (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences) e cromatografia em coluna de troca de cátions (SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH). Então, resina ActiClean Etox (Sterogen) foi usada para reduzir os pirogênios para abaixo do limite de detecção.

Exemplo de Referência 4

Eficácia de BM095 sobre a colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS)

O modelo de colite induzida por DSS (J Immunol 2003; 171: 5507-5513), o qual foi reportado como um modelo patológico para doença

inflamatória do intestino (IBD), foi preparado para examinar o efeito do BM-095, um anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo. Uma solução aquosa de sal dextrana sulfato de sódio a 5% (peso/v) (Wako Pure Chemical Industries) foi preparada usando água destilada esterilizada por filtração com
5 um filtro de 0,22 μ m (Millipore). Camundongos Balb/cAnN Crj machos de seis semanas de idade (Charles River Laboratories, Japão) foram deixados consumir livremente a solução das garrafas de água durante sete dias. Os pesos corporais foram medidos e a alteração percentual no peso corporal com relação àquela no primeiro dia de administração de DSS foram usados
10 para avaliar a eficácia do fármaco.

De forma a testar se a condição patológica é aprimorada nesse modelo através de neutralização de sinalização à IL-31, o anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo BM095 foi intravenosamente administrado a 10 mg/kg um dia antes da administração de DSS e a perda de peso
15 foi avaliada (n = 10). Ao grupo de controle com veículo, o veículo (uma mistura de tampão de acetato (acetato de sódio a 20 mmol/L, cloreto de sódio a 20 mmol/L) e solução salina tamponada com fosfato (PBS; GIBCO) em uma proporção volumétrica de 1 : 5) foi intravenosamente administrado um dia antes da administração de DSS (grupo com veículo; n = 10). Além disso,
20 alterações de peso corporal percentual de um camundongo Balb/cAnN Crj da mesma idade e sexo conforme aqueles no grupo com administração de DSS foram também monitoradas (n = 1) para avaliar as alterações de peso corporal percentual de camundongos normais.

O curso de tempo de alterações do peso corporal é mostrado na
25 figura 3. A administração de DSS resultou em uma diminuição no peso corporal percentual no grupo com veículo. Por outro lado, o grupo administrado com BM095 mostrou alterações de peso corporal similares ao grupo com veículo; contudo, após quatro e cinco dias da administração de DSS, uma diminuição significativa do peso corporal percentual foi observada no grupo
30 com BM095 quando comparado com o grupo com veículo. A partir desses resultados, a administração de BM095 não teve efeito terapêutico sobre a colite nesse modelo.

Embora expressão de IL-31RA fosse reportada como sendo intensificada nesse modelo (WO 2004/003140), os resultados experimentais acima revelaram que anticorpos de neutralização contra a molécula não tinham efeito terapêutico contra colite nesse modelo.

5 Exemplo de Referência 5

Eficácia de BM095 sobre o modelo de dermatite de contato aguda induzida por cloreto de picrila

Dermatite resultante de reação de hipersensibilidade retardada induzida/sensibilizada pela aplicação de cloreto de picrila, a qual foi reportada como um modelo de dermatite de contato aguda (Clin Immunol 2003; 108: 257-262), foi criada para avaliar o efeito de BM-095, um anticorpo de neutralização anti-NR10 de camundongo. Camundongos Balb/cAnN Crj fêmeas de oito semanas de idade (Charles River Laboratories, Japão) foram sensibilizados através da aplicação de 50 µL de solução de cloreto de picrila a 7% (Nacalai Tesque, Inc.) (etanol : acetona = 3:1, v/v) sobre a pele abdominal. Após cinco dias, dermatite de contato foi estimulada através da aplicação de 20 µL de solução de cloreto de picrila a 1% (acetona : óleo de oliva = 1:4, v/v) sobre a pele da aurícula direita (indução). Para um controle para avaliação da influência do solvente sobre a espessura auricular, 20 µl do solvente (acetona: óleo de oliva = 1:4, v/v) foram aplicados sobre a pele da aurícula esquerda dos mesmos camundongos (controle positivo; n = 6). A espessura das aurículas direita e esquerda foi medida com um Dispositivo para medição de espessura ("Dial Thickness Gauge" -OZAKI MFG. CO., LT-DA.) imediatamente antes de indução e 24, 48 e 72 horas após indução. A alteração na espessura auricular com relação à espessura imediatamente antes de indução foi usada para avaliar a eficácia do fármaco.

Para avaliar o estabelecimento da condição patológica, um grupo no qual solução misturada de etanol-acetona (3:1, v/v) sem cloreto de picrila foi aplicada sobre a pele abdominal no momento de sensibilização e após cinco dias 20 µL de solução de cloreto de picrila a 1% foram aplicados sobre a pele da aurícula direita e 20 µl do solvente (acetona: óleo de oliva = 1:4, v/v) foram aplicados à pele da aurícula esquerda, foi estudado como um grupo

de controle (grupo de controle negativo; n = 6).

Para avaliar o efeito da administração de anticorpo anti-NR10 sobre a condição patológica nesse modelo, um grupo no qual dermatite de contato aguda foi estimulada por meio do método usado para o grupo de controle positivo acima e 10 mg/kg de BM095 foram intravenosamente administrados um dia antes de sensibilização e um dia antes de indução (grupo com BM095, n = 6) e um grupo no qual veículo (uma mistura de tampão de acetato (acetato de sódio a 20 mmol/L, cloreto de sódio a 20 mmol/L) e solução salina tamponada com fosfato (PBS; GIBCO) em uma proporção volumétrica de 1:5) foram administrados ao mesmo tempo (grupo com veículo, n = 5), foram estudados.

O curso de tempo das alterações de espessura auricular até 72 horas após indução é mostrado na figura 4. As aurículas estavam significativamente espessadas no grupo de controle positivo em todos os pontos de tempo de 24, 48 e 72 horas após indução, quando comparado com o grupo de controle negativo, mostrando o estabelecimento da condição patológica. Entretanto, o grupo com BM-095 mostrou um curso de tempo de alterações da espessura auricular similar ao grupo com veículo e, assim, nenhuma supressão significativa foi observada.

Esses resultados revelaram que a administração de BM095 não teve efeito terapêutico contra dermatite de contato aguda observada nesse modelo.

Aplicabilidade Industrial

Antagonistas de NR10, tais como anticorpos de neutralização contra NR10, proporcionados pela presente invenção são úteis como agentes terapêuticos ou conservantes para prurido.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo anti-NR10 (novo receptor de citocina 10) tendo uma atividade de neutralização contra NR10, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um agente preventivo ou terapêutico para prurido
5 que é causado pela sinalização de IL-31, em que o anticorpo anti-NR10 compreende uma região variável de cadeia pesada correspondente aos aminoácidos 1 a 121 da SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve correspondente aos aminoácidos 1 a 107 da SEQ ID NO: 18.
2. Uso de um anticorpo anti-NR10 (novo receptor de citocina 10)
10 tendo uma atividade de neutralização contra NR10, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um agente preventivo ou terapêutico para prurido que é causado pela sinalização de IL-31, em que o anticorpo é (i) um anticorpo quimerizado do anticorpo como definido na reivindicação 1, ou (ii) um anticorpo humanizado do anticorpo como definido na reivindicação 1.
- 15 3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.
4. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo recombinante.
5. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato
20 de que o NR10 é um NR10 humano.
6. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-NR10 reconhece um sítio nas posições 21-120 da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 7.
7. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo
25 fato de que o anticorpo anti-NR10 compreende CDRs de cadeia pesada 1-3 da SEQ ID NO: 17, em que CDR1 da SEQ ID NO: 17 corresponde aos aminoácidos 31 a 35, CDR2 da SEQ ID NO: 17 corresponde aos aminoácidos 50 a 66, e CDR3 da SEQ ID NO: 17 corresponde aos aminoácidos 99 a 110, e CDRs de cadeia leve 1-3 da SEQ ID NO: 18, em que CDR1 da SEQ ID
30 NO: 18 corresponde aos aminoácidos 24 a 34 CDR2 da SEQ ID NO: 18 corresponde aos aminoácidos 50 a 56 e a CDR3 da SEQ ID NO: 18 corresponde aos aminoácidos 89 a 97.

8. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-NR10 é um scFv.

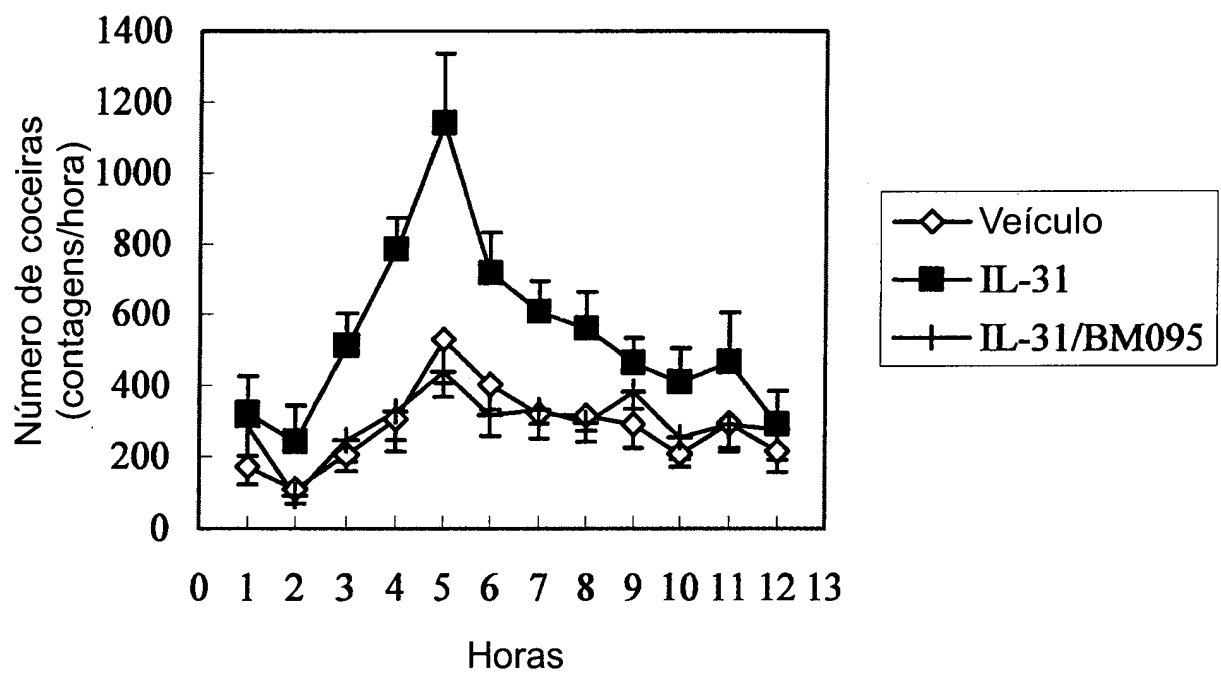


FIG. 1

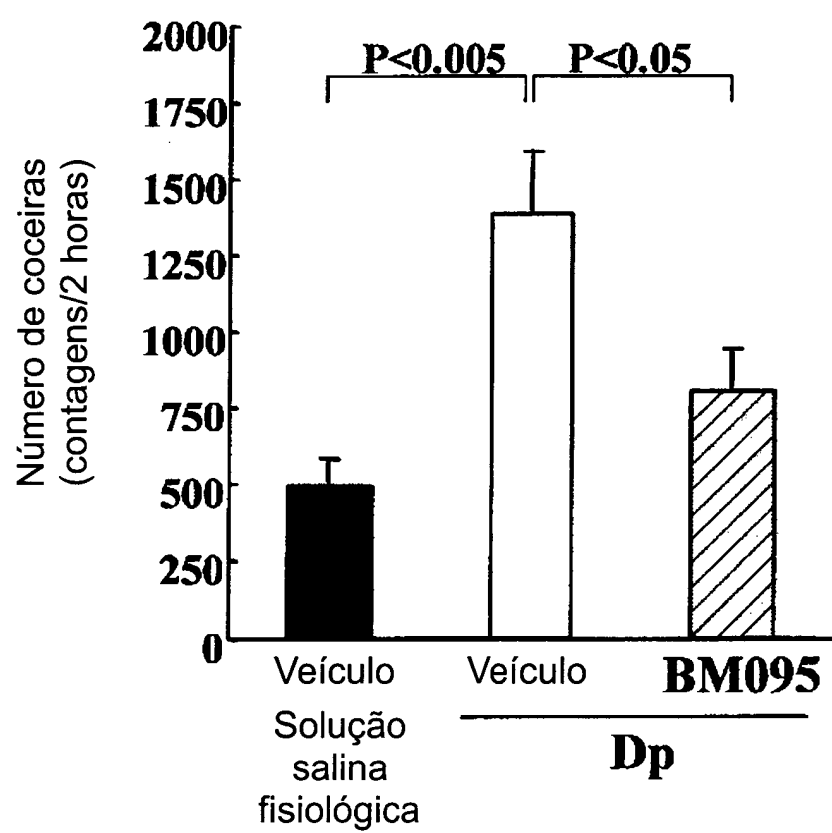
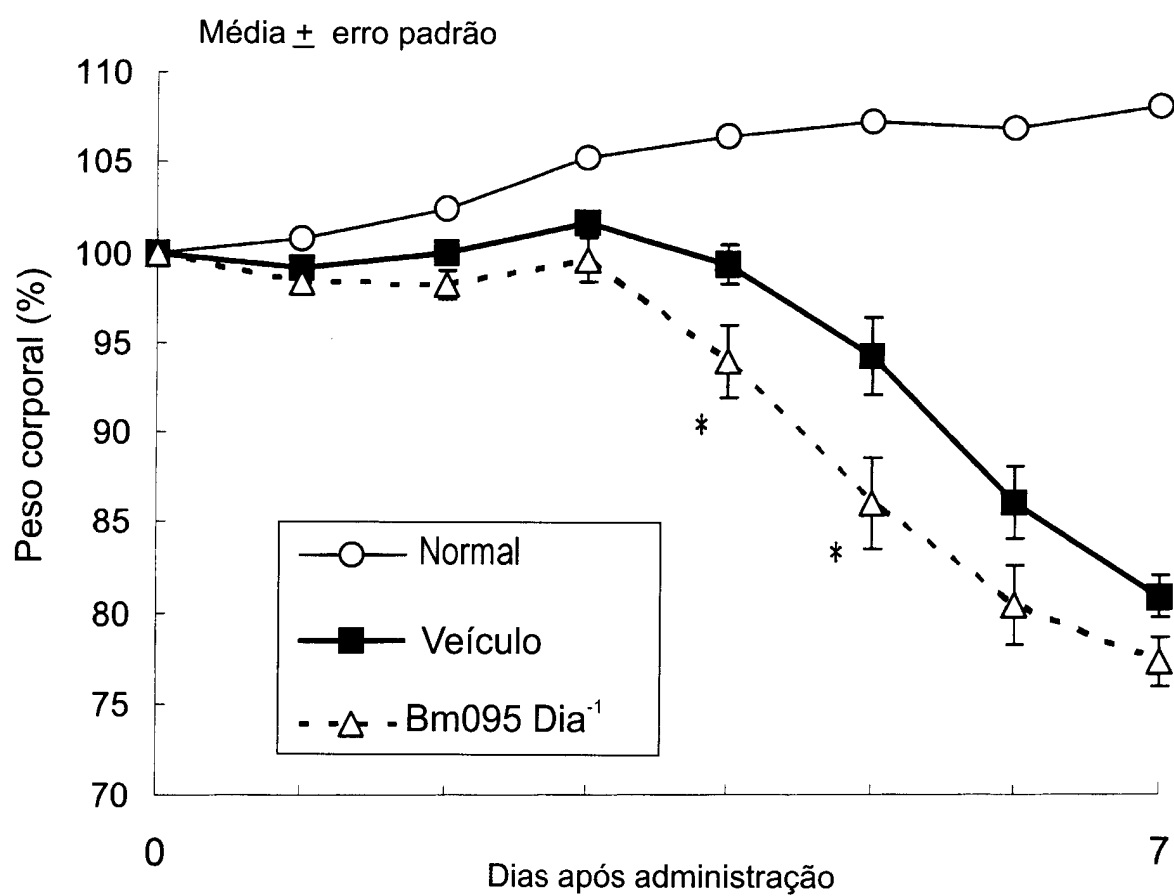
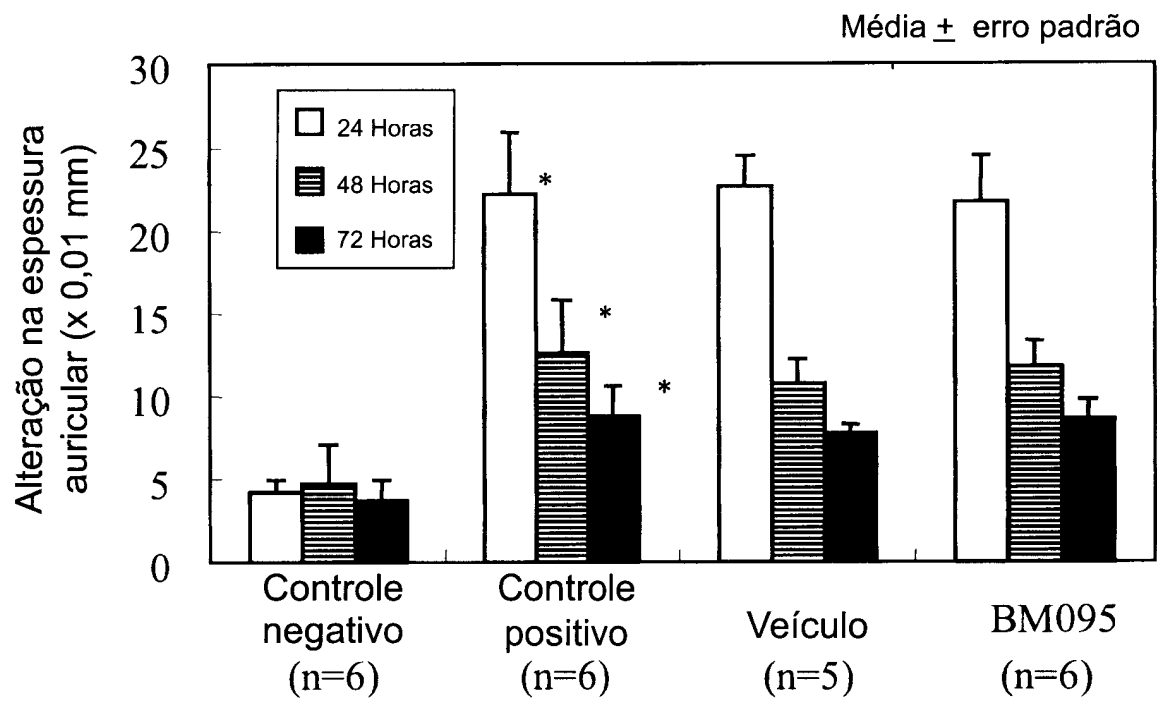


FIG. 2



*P < 0,05, t-teste de Student com relação ao grupo com veículo

FIG. 3



*P < 0,05, t -teste de Student com relação ao grupo de controle negativo

FIG. 4

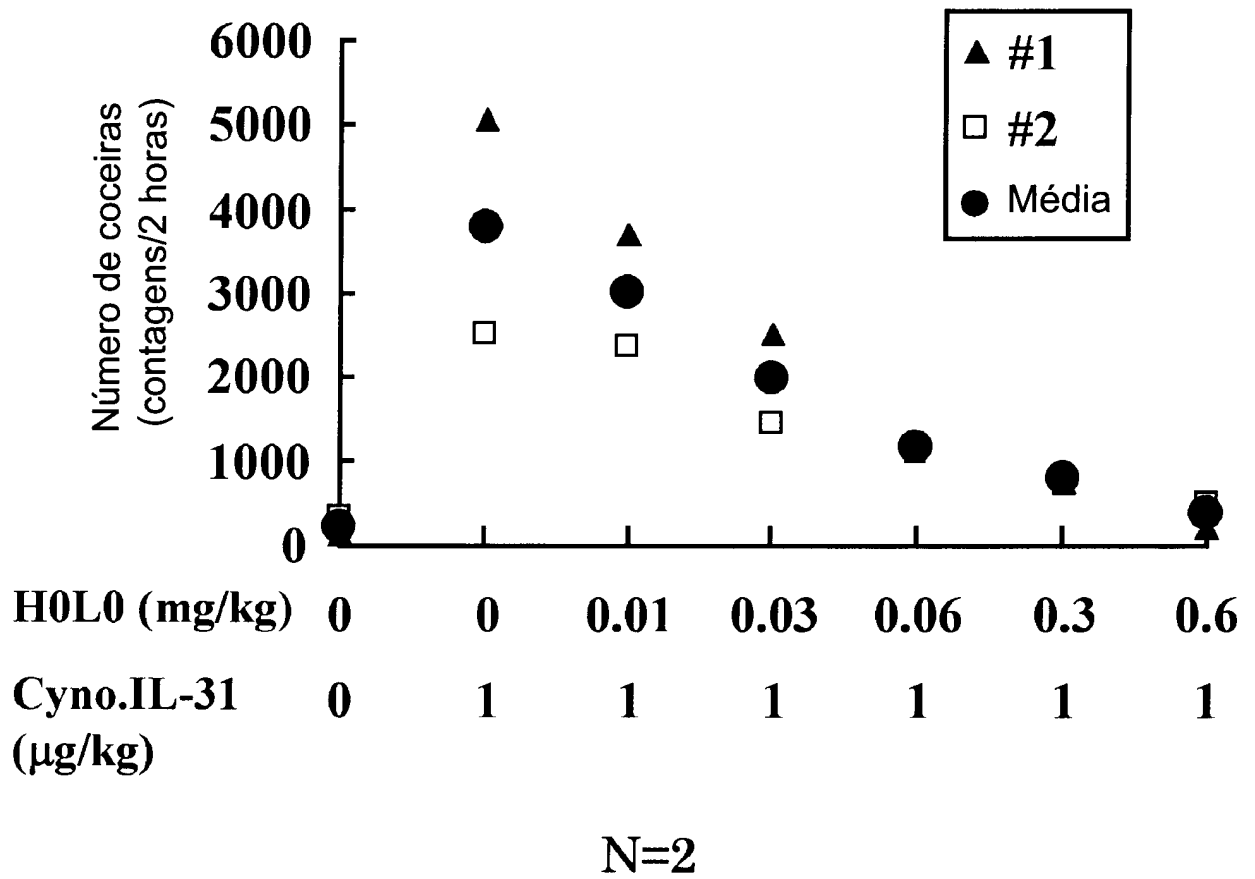


FIG. 5