



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

(21) PI 0715660-0 A2



* B R P I 0 7 1 5 6 6 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 04/09/2007
(43) Data da Publicação: 02/07/2013
(RPI 2217)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/24
A61K 39/395
C12N 5/18
A61P 37/00
A61P 17/00

(54) **Título:** ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE ANTICORPO, MÉTODOS PARA REDUZIR, BLOQUEAR, INIBIR, OU NEUTRALIZAR INFLAMAÇÃO, PRURITE E ARRANHADURA EM UM MAMÍFERO, E, ANTICORPO ISOLADO

(30) **Prioridade Unionista:** 01/09/2006 US 60/824403, 20/02/2007 US 60/890792

(73) **Titular(es):** Zymogenetics, Inc.

(72) **Inventor(es):** Anthony W. Siadak, Janine Bilsborough, Shirley Rene

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & Cia

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007077555 de 04/09/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/028192 de 06/03/2008

(57) **Resumo:** ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE ANTICORPO, MÉTODOS PARA REDUZIR, BLOQUEAR, INIBIR, OU NEUTRALIZAR INFLAMAÇÃO, PRURITE E ARRANHADURA EM UM MAMÍFERO, E, ANTICORPO ISOLADO. São obtidas novas composições derivadas de sítios de ligação em antígeno de imunoglobulinas tendo afinidade por IL-3 1. As composições exibem propriedades de ligação imunológicas de moléculas de anticorpo capazes de ligação especificamente em uma IL-3 1 de humano. São obtidas regiões CDR derivadas de mesmos ou diferentes grupos de imunoglobulinas. Também são obtidos polipeptídeos de cadeia única nos quais os domínios VH e VL estão ligados. As moléculas sFv podem incluir grupos de polipeptídeo ancilares que podem ser bioativos, ou que proporcionam um sítio de ligação para outros grupos úteis. As composições são úteis em ensaios de ligação específicos, esquemas de purificação por afinidade, seleção de toxina ou droga, imagem, e agentes terapêuticos imunológicos ou genéticos para doenças inflamatórias. A invenção deste modo proporciona polipeptídeos novos, os DNAs codificadores daqueles polipeptídeos, cassetes de expressão compreendendo aqueles DNAs, e métodos de indução da produção dos polipeptídeos. A invenção adicionalmente proporciona as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis dos anticorpos monoclonais e o uso destes anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo juntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

```
VL      1      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
652/98127  DIQHTSPALSLASVGGTFTTCAGSGHNTLVYQDQSGPGLAVYATLADGVPSPGSGSDGTFLEISLQSPSTYTCNPSTT
292.12.3.1 .....
292.84.1.6 .....
292.72.3.1 .....
          CDR 1          CDR 2
VH      1      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
982      QVGGGPGALLVPGHSLTCSASDTFTTCTHSGPQGLSGLTIFRAGDHTYGGTFSTATVPSKSTANSLSELSTEDANTYCAE
292.12.3.1 .....
292.84.1.6 .....
292.72.3.1 .....
          CDR 1          CDR 2          CDR 3
```

“ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE ANTICORPO, MÉTODOS PARA REDUZIR, BLOQUEAR, INIBIR, OU NEUTRALIZAR INFLAMAÇÃO, PRURITE E ARRANHADURA EM UM MAMÍFERO, E, ANTICORPO ISOLADO”

5 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A pele desempenha um papel importante no sistema imune e consiste de camadas. A epiderme é uma camada superficial. Debaixo da epiderme está a derme, uma camada de tecido conjuntivo. Debaixo da derme, está a hipoderme, uma camada de quantidades grandes de tecido adiposo.

10 Linfócitos T circulantes migram para a pele sob condições normais e inflamatórias. O antígeno linfócito cutâneo (CLA) é considerado um receptor residente para células-T com tropismo para a pele. Santamaria-Babi, L., *Eur. J. Dermatol.* 14:13-18, 2004.

15 Várias doenças de pele são conhecidas em expressarem níveis altos de células-T CLA+, incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso. Há uma necessidade de tratamento de tais doenças de pele mediadas por célula-T.

20 As atividades *in vivo* demonstradas da família de citocinas ilustram o potencial clínico enorme de, e a necessidade de, outras citocinas, agonistas de citocina, e antagonistas de citocina. IL-31, uma citocina recentemente identificada, quando sobre-expressada em camundongos, resulta em sintomas semelhantes à dermatite. Tanto células-T residentes em pele
25 quanto epidérmicos têm estado implicados na patologia de doenças de pele em humanos. A presente invenção atende às necessidades pela obtenção de antagonistas para citocina pró-inflamatória IL-31. Tais antagonistas da presente invenção, que podem bloquear, inibir, reduzir, antagonizar ou neutralizar a atividade de IL-31, incluem receptores IL-3 IRA solúveis e

anticorpos neutralizadores anti-IL-31. A invenção adicionalmente proporciona usos dos mesmos em doença inflamatória, bem como composições e métodos relacionados.

5 Tecnologia de anticorpo monoclonal tem proporcionado uma vasta coleção de agentes terapêuticos bem como diagnósticos para uso em identificação e tratamento de doença. Muitas aplicações clínicas têm focalizado anticorpos monoclonais murinos anti-humano, que são produzidos em células de camundongo mas que especificamente se ligam em um antígeno de humano. Em adição, anticorpos quiméricos compostos de
10 seqüências de aminoácido de humano e de não-humano estão sendo desenvolvidos. Particularmente, moléculas de anticorpo híbridas tendo regiões variáveis derivadas de, por exemplo, uma imunoglobulina murina fusionada em regiões constantes derivadas de uma imunoglobulina de humano têm sido descritos. Veja e.g., Pat. U.S. No. 4.816.567; Winter et al.
15 (1991) *Nature* 349:293-299; e Lobuglio et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224. Ademais, visto que regiões constantes não são exigidas para ligação ou reconhecimento de antígeno, fragmentos de anticorpo tais como F(ab), F(ab')₂ e Fv que não compreendem a porção Fc têm sido identificados como candidatos úteis para terapia clínica.

20 Numerosas moléculas biossintéticas e recombinantes compreendendo sítios de ligação em antígeno de roedor têm sido descritas. Particularmente, moléculas tendo sítios de ligação em antígeno de roedor construídas diretamente sobre anticorpos de humano por graftização apenas do sítio de ligação de roedor, em vez de o domínio variável inteiro, em
25 domínios de cadeia pesada e leve de imunoglobulina de humano têm sido descritas. Veja, e.g., Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327 e Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536. Moléculas tendo um sítio de ligação em antígeno nas quais pelo menos uma das regiões determinantes de complementaridade (CDRS) do domínio variável é derivada de um anticorpo

monoclonal murino e as partes derivadas de imunoglobulina restantes da molécula são derivadas de imunoglobulina de humano têm sido descritas em Publicação de Patente U.K No. GB 2.276.169, publicada aos 21 de Setembro de 1994. Numerosos polipeptídeos de sítio de ligação em antígeno de cadeia
5 única e moléculas de Fv de cadeia única (sFv) também têm sido descritos. Veja, e.g., Pat. U.S. Nos. 5.132.405 e 5.091.513 de Huston et al.; e Pat. U.S. No. 4.946.778 de Ladner et al.

A(s) função(ões) efetora(s) do domínio Fc de um anticorpo incluem fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, regulação de
10 produção de anticorpos, e o mais importante citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC). O grau com o qual qualquer uma destas funções efetoras são induzidas depende da interação do domínio Fc com os mediadores de proteína relevantes, C1q e os receptores Fcγ, e difere
15 dependendo das regiões constantes (Fc) de subclasse de IgG e de sua interação com estas proteínas.

O domínio Fc de IgG1 interage com FcγRI, FcγRIIa, e FcγRIII sobre células efetoras de sistema imune. O papel preciso dos receptores Fcγ diferentes permanece para ser elucidado mas FcγRIIIA é considerado em ser
20 o receptor mediador de ADCC mais importante expressado primariamente em células NK mas também monócitos e macrófagos. IgG1 também se liga em C1q e pode causar CDC que é mediada principalmente por células NK expressando FcγRIII. O domínio IgG4 Fc tem largamente reduzido afinidade de ligação por C1q e receptores Fcγ diferentes, correspondendo às ADCC e
25 CDC reduzidas. Enquanto que IgG 1 mostra atividade geralmente alta para ambas ADCC e CDC, IgG4 é considerada em ter uma atividade baixa ou nula para ADCC ou CDC.

A afinidade de ligação de IgG4 mAb efetor negativo é grandemente reduzida se não abolida quando comparada com os outros mAbs

de isótipo IgG. Contudo, a capacidade para interagir com o receptor Brambell (FcRn) é retida em IgG4 afetando deste modo a farmacocinética do mAb de isótipo IgG4 através de uma meia-vida aumentada.

Assim, há uma necessidade de moléculas que proporcionem as seqüências de aminoácidos de anti-IL3 de humano conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano para tratar inflamação mediada por IL-31.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias leves e cadeias pesadas de clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, e 294.144.3.5.

Figura 2 é um alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis das cadeias leves e cadeias pesadas de clones 292.12.3.1 e 292.84.1.6.

Figuras 3 e 4 são um alinhamento um alinhamento das seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia leves e pesadas de anticorpos monoclonais de camundongo anti-IL31 de humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Antes de descrever a invenção em detalhe, pode ser útil para o seu entendimento a definição dos seguintes termos:

Como aqui usado, o termo "anticorpos" inclui anticorpos policlonais, anticorpos policlonais purificados por afinidade, anticorpos monoclonais, e fragmentos de ligação em antígeno, tais como fragmentos proteolíticos Fab e F(ab')₂. Anticorpos intactos ou fragmentos geneticamente engenhados, tais como anticorpos quiméricos, fragmentos Fv, anticorpos de cadeia única e semelhante, bem como polipeptídeos e peptídeos de ligação em antígeno sintéticos, também estão incluídos. Anticorpos de não-humano podem ser humanizados por graftização de CDRs de não-humano em regiões constantes e de molde de humano, ou por incorporação dos domínios variáveis inteiros de não-humano (opcionalmente "ocultando-os" com uma

superfície humana-semelhante pela substituição de resíduos expostos, sendo que o resultado é um anticorpo "folheado"). Em alguns casos, anticorpos humanizados podem reter resíduos de não-humano dentro dos domínios de molde de região variável de humano para intensificar as características de ligação apropriadas. Através de humanização de anticorpos, meia-vida biológica pode ser aumentada, e o potencial para reações imunes adversas sob administração a humanos é reduzido.

O termo "anticorpo quimérico" ou "anticorpos quiméricos" refere-se aos anticorpos cujos genes de cadeias leves e pesadas têm sido construídos, tipicamente por engenharia genética, a partir de genes de regiões constantes e variáveis de imunoglobulina pertencendo a espécies diferentes. Por exemplo, os segmentos variáveis dos genes de um anticorpo monoclonal de camundongo podem ser unidos nos segmentos constantes de humano, tais como gama 1 e gama 3. Um anticorpo quimérico terapêutico típico é deste modo uma proteína híbrida composta do domínio de ligação em antígeno ou variável de um anticorpo de camundongo e o domínio constante de um anticorpo de humano, embora outras espécies de mamífero possam ser usadas.

Como aqui usado, o termo "imunoglobulina" refere-se a uma proteína consistindo de um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de 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 cadeia pesada. Em cada par, as regiões variáveis de cadeia leves e pesadas são juntas responsáveis pela ligação em um antígeno, e as regiões constantes são responsáveis pelas funções efectoras de anticorpo.

"Cadeias leves" de imunoglobulina de comprimento total (cerca de 25 Kd ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene de região variável na terminação-NH₂ (cerca de 110 aminoácidos) e um gene de região

constante kappa ou lambda na terminação- COOH. "Cadeias pesadas" de imunoglobulina de comprimento total (cerca de 50 Kd ou 446 aminoácidos), são similarmente codificadas por um gene de região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes de região constante acima mencionados

5 (cerca de 330 aminoácidos). Cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou epsilon, e definem o isótipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada incluindo uma região "D" de cerca de

10 10 ou mais aminoácidos. (Veja geralmente, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7 (incorporada como referência em sua totalidade para todos os propósitos).

Uma região variável de cadeia leve ou pesada de imunoglobulina consiste de uma região "de molde" interrompida por três

15 regiões hipervariáveis. Deste modo, o termo "região hipervariável" refere-se aos resíduos de aminoácido de um anticorpo que são responsáveis pela ligação em antígeno. A região hipervariável compreende os resíduos de aminoácido de uma "Região Determinante de Complementaridade" ou "CDR" (i.e., resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de

20 cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/ou aqueles resíduos de uma "alça hipervariável" (i.e., resíduos 26-

25 32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917) (ambas as quais são aqui incorporadas como referências). Resíduos de "Região de molde" ou "FR" são aqueles resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de região hipervariável como aqui definido. As seqüências das regiões de molde das

cadeias leves ou pesadas diferentes estão relativamente conservadas dentro de uma espécie. Assim, uma "região de molde de humano" é uma região de molde que é substancialmente idêntica (cerca de 85% ou mais, normalmente 90-95% ou mais) à região de molde de uma imunoglobulina de humano naturalmente ocorrente. A região de molde de um anticorpo, que é as regiões de molde combinadas das cadeias leves e pesadas constituintes, serve para posicionar e alinhar as CDR's. As CDR's são primariamente responsáveis pela ligação de um epítipo de um antígeno.

Conseqüentemente, o termo imunoglobulinas "humanizadas" refere-se a uma imunoglobulina compreendendo uma região de molde de humano e uma ou mais CDR's de uma imunoglobulina de não-humano (normalmente de camundongo ou rato). A imunoglobulina de não-humano proporcionando as CDR's é chamada de a "doadora" e a imunoglobulina de humano proporcionando o molde é chamada de a "aceptora". Regiões constantes não necessitam estar presentes, mas se estiverem, elas precisam ser substancialmente idênticas às regiões constantes de imunoglobulina de humano, i.e., pelo menos cerca de 85-90%, preferivelmente cerca de 95% ou mais idênticas. Disso, todas as partes de uma imunoglobulina humanizada, exceto possivelmente as CDR's, são substancialmente idênticas às partes correspondentes das seqüências de imunoglobulina de humano natural. Um "anticorpo humanizado" é um anticorpo compreendendo uma imunoglobulina de cadeia pesada humanizada e uma cadeia leve humanizada. Por exemplo, um anticorpo humanizado não incluiria um anticorpo quimérico típico como definido acima, e.g., porque a região variável inteira de um anticorpo quimérico é não-humana.

O termo "anticorpos geneticamente alterados" significa anticorpos nos quais a seqüência de aminoácidos tem sido variada daquela de um anticorpo nativo. Por causa da relevância das técnicas de DNA recombinante na geração de anticorpos, não é necessário se prender às

seqüências de aminoácidos encontradas em anticorpos naturais; anticorpos podem ser reprojatados para obter as características desejadas. As variações possíveis são muitas e variam da mudança de apenas um ou uns poucos aminoácidos ao reprojeto completo de, por exemplo, a região constante ou variável. Mudanças na região constante serão feitas, em geral, com o propósito de melhorar ou alterar as características, tais como fixação de complemento, interação com membranas e outras funções efetoras. Mudanças na região variável serão feitas para melhorar as características de ligação em antígeno.

Em adição aos anticorpos imunoglobulinas podem existir em uma variedade de outras formas incluindo, por exemplo, de cadeia única ou Fv, Fab, e (Fab')₂, bem como diacorpos, anticorpos lineares, anticorpos híbridos multivalentes ou multiespecíficos (como descrito acima e em detalhe em: Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) e em cadeias únicas (e.g., 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 como referências). (Veja, geralmente, Hood et al., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2nd ed. (1984), e Hunkapiller e Hood, Nature, 323, 15-16 (1986), que são aqui incorporadas como referências).

Como aqui usados, os termos "Fv de cadeia única", "anticorpos de cadeia única", "Fv" ou "scFv" referem-se aos fragmentos de anticorpo que compreende as regiões variáveis de ambas as cadeias pesada e leve, mas falta as regiões constantes, mas dentro de uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, um anticorpo de cadeia única adicionalmente compreende um *linker* polipeptídeo entre os domínios VH e VL que permite que ele forme a estrutura desejada que permitiria a ligação em antígeno. Anticorpos de cadeia única são discutidos em detalhe por Pluckthun em "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); veja também Publicação de

Patente Internacional No. WO 88/01649 e Pat. U.S. Nos. 4.946.778 e 5.260.203, cujas descrições são aqui incorporadas como referências para qualquer propósito. Em modalidades específicas, anticorpos de cadeia única também podem ser bi-específicos e/ou humanizados.

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

10 Um "fragmento Fab" contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada que contém mais da região constante, entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de tal modo que uma ligação de dissulfeto intercadeias possa ser formada entre as duas cadeias pesadas para formar uma molécula $F(ab')_2$.

15 Um "fragmento $F(ab')_2$ " contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção da região constante entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de tal modo que ligação de dissulfeto intercadeias é formada entre as duas cadeias pesadas.

20 Pesos moleculares e comprimentos de polímeros determinados por métodos analíticos imprecisos (e.g., eletroforese em gel) serão entendidos como sendo valores aproximados. Quando um tal valor é expressado como "cerca de" X, o valor informado será entendido como sendo acurado em $\pm 10\%$.

Todas as referências aqui citadas são incorporadas como referências em suas totalidades.

25 A presente invenção é baseada em parte na determinação das seqüências de aminoácidos de anticorpos monoclonais que foram descritos em Pedido de Patente U.S. de co-propriedade de No. Serial 11/430.066, depositado aos 8 de Maio de 2006, que foi publicado aos 7 de Dezembro de 2006 como Publicação de Patente U.S. No. 2006-0275296, aqui incorporada como referência. Hibridomas expressando anticorpos monoclonais

neutralizadores para IL-31 de humano descrita acima foram depositados com o depósito de patente em American Type Tissue Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd, Manassas VA 20110-2209) como depósitos originais sob o Tratado de Budapeste e receberam os seguintes Nos de Acesso: clone 5 292.12.3.1 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6815, depositado aos 28 de Junho de 2005); clone 292.72.3.1 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6816, depositado aos 28 de Junho de 2005); clone 292.63.5.3 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6829, depositado aos 6 de Julho de 2005); clone 292.118.6.4 10 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6830, depositado aos 6 de Julho de 2005); clone 294.163.2.1 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6831, depositado aos 6 de Julho de 2005); clone 292.84.1.6 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6871, depositado aos 19 de Julho de 2005); clone 294.35.2.6.3 (Designação de 15 Depósito de Patente em ATCC de PTA-6872, depositado aos 19 de Julho de 2005); clone 294.154.5.6 Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6875, depositado aos 19 de Julho de 2005); e clone 294.144.3.5 (Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6873, depositado aos 19 de Julho de 2005).

20 A presente invenção proporciona seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeias leves e pesadas dos anticorpos monoclonais produzidos por estes hibridomas para serem usados para gerar anticorpos e fragmentos de anticorpo, que se ligam no ligante IL-31 e podem ser usados conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano, por exemplo pela 25 expressão como uma proteína de fusão, para antagonizar IL-31 deste modo inibido, bloqueando, reduzindo, ou neutralizando inflamação em geral, e os sintomas de dermatite e doenças pruríticas. Tais anticorpos ou fragmentos de anticorpo, compreendem ou consistem de uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, e podem ser quiméricos,

humanizados, ou fragmentos de anticorpo que neutralizam, inibem, reduzem, previnem ou minimizam os efeitos de IL-31 sobre seu receptor. Resultados clínicos do anticorpo ou dos fragmentos de anticorpo podem ser uma redução em doenças inflamatórias, tais como dermatite e doenças pruríticas como
5 mais adiante aqui descrito. Em uma modalidade, a dermatite é dermatite atópica. Em outra modalidade a dermatite é prurigo nodular. Em outra modalidade, a dermatite é eczema.

IL-31 é uma citocina de célula-T recentemente descoberta que, quando sobre-expressa em camundongos, resulta em sintomas semelhantes
10 a dermatite. Veja também, Dillon, et al., *Nature Immunol.* 5:752-760, 2004. Ambos queratinócitos epidérmicos e de células-T residentes em pele têm estado implicados na patologia de doenças de pele em humanos. Expressão de proteína e IL-31 mRNA é restrita à população de células-T CLA⁺ residente em pele em ambos pacientes com dermatite atópica (AD) e indivíduos
15 normais, enquanto que análise do receptor para IL-31, IL-3 IRA, por imunohistoquímica(IHC) sugere níveis ligeiramente mais altos de expressão de IL-31 RA sobre queratinócitos de pele em biopsias de pele de sofredores de AD crônica ou aguda comparados com indivíduos normais.

IL-31 é o nome HUGO para uma citocina que tem sido
20 previamente descrita como Zcytol7rlig em um pedido de Patente U.S. publicado (veja número de publicação de 20030224487, Sprecher, Cindy et al., 2003, aqui incorporada como referência). Veja também, Dillon, et al., *Nature Immunol.*, supra. O receptor heterodimérico para IL-31 também foi descrito em 20030224487 como zcytor17 (nome HUGO, IL-3 IRA) que
25 forma um heterodímero com receptor beta OncostatinM (OSMRbeta). IL-31 foi isolada de uma biblioteca de cDNA gerada de células de sangue periférico de humano (hPBCs), que foram selecionadas para CD3. CD3 é um marcador de superfície de célula único para células de origem linfóide, particularmente células-T. A seqüência de polipeptídeo para IL-31 de humano é mostrada em

SEQ ID NO:2. A seqüência de polipeptídeo para IL-31 murina é mostrada em SEQ ID NO:4. Como aqui usado o termo, IL-31 significa IL-31 como usada em Publicação de Patente U.S. de Número 20030224487, como mostrado acima. A seqüência de sinal secretório de IL-31 é compreendida de resíduos de aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala), e o polipeptídeo maduro é compreendido de resíduos de aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como mostrado em SEQ ID NO:2). Ademais análise de seqüenciamento N-terminal de IL-31 purificada de células 293T mostrou uma terminação-N em resíduo 27 (Leu) como mostrado em SEQ ID NO:2, com o polipeptídeo maduro compreendido de resíduos de aminoácido 27 (Leu) a 164 (Thr) (como mostrado em SEQ ID NO:2).

IL-31 é o nome HUGO para uma citocina que tem sido previamente descrita como Zcytol7rlig em um Pedido de Patente U.S. Publicado (veja número de publicação 20030224487, Sprecher, Cindy et al., 2003, aqui incorporada como referência). Veja também, Dillon, et al., Nature Immunol., supra. O receptor heterodimérico para IL-31 também foi descrito em 20030224487 como zcytor17 (nome HUGO, IL-3 IRA) que forma um heterodímero com receptor beta OncostatinM (OSMRbeta). IL-31 foi isolada de uma biblioteca de cDNA gerada de células de sangue periférico de humano (hPBCs) ativadas, que foram selecionadas para CD3. CD3 é um marcador de superfície de célula único para células de origem linfóide, particularmente células. As seqüências de polinucleotídeo e de polipeptídeo para IL-31 de humano são mostradas em SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente. As seqüências de polinucleotídeo e de polipeptídeo para IL-31 murina são mostradas em SEQ ID NOs: 3 e 4, respectivamente. Como aqui usado o termo, IL-31 significa IL-31 como usada em Publicação de Patente U.S. de número 20030224487, como mostrado acima. A seqüência de sinal secretório de IL-31 é compreendida de resíduos de aminoácido 1 (Met) a 23 (Ala), e o polipeptídeo maduro é compreendido de resíduos de aminoácido 24 (Ser) a 164 (Thr) (como mostrado em SEQ ID NO:2). Ademais análise de

seqüenciamento N-terminal de IL-31 purificada de células 293T mostrou uma terminação-N em resíduo 27 (Leu) como mostrado em SEQ ID NO:2, com o polipeptídeo maduro compreendido de resíduos de aminoácido 27 (Leu) a 164 (Thr) (como mostrado em SEQ ID NO:2).

5 A seqüência de polipeptídeo para o IL-3 IRA (receptor de IL-31) é mostrada em SEQ ID NO:5, e a seqüência de polipeptídeo para receptor beta OncostatinM (OSMRbeta) é mostrada em SEQ ID NO:6.

10 Os receptores IL-3 IRA e OSMRbeta pertencem à subfamília de receptores de citocina de Classe I que inclui, mas não é limitada a, aos receptores para IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF e G-CSF (para uma revisão veja, Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily" em Cytokine 5(2): 95-106, 1993). A subunidade IL-31RA é totalmente descrita em Pedido de Patente PCR de Propriedade Comum de No. US01/20484 (Publicação WIPO de No. WO 02/00721). Análise da
15 distribuição em tecido do mRNA da subunidade IL-3 IRA revelou expressão em subconjuntos de células-T CD4+ e CD8+ ativadas, monócitos CD 14+, e expressão mais fraca em células-B CD 19+. Além disso, o mRNA estava presente em ambas as linhagens de célula monocítica em repouso ou ativadas THP-1 (ATCC No. TIB-202), U937 (ATCC No. CRL-1593.2) e HL60
20 (ATCC No. CCL-240).

 Inibição, neutralização, ou bloqueio de transdução de sinal pelas moléculas compreendendo um domínio variável de cadeia leve e/ou um domínio variável de cadeia pesada, chamadas aqui de "moléculas ligantes de IL-31" ou "antagonistas de IL-31", pode ser medido por numerosos ensaios
25 conhecidos por uma pessoa experiente na arte. Por exemplo, ensaios medindo uma redução em proliferação incluem ensaios para redução de um corante tal como AlamarBlue™ (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio), brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983); 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-3-carbóxi-metóxi-fenil-

2H-tetrazólio; hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-5-[(fenil-amino)-carbonil]-2H-tetrazólio; e cloreto de ciano-ditolil-tetrazólio (que estão comercialmente disponíveis em Polysciences, Inc., Warrington, PA); ensaios de mitogênese, tal como medição de incorporação de ^3H -timidina; ensaios de exclusão de corante usando, por exemplo, negro de naftaleno ou azul de tripano; captação de corante usando diacetil-fluoresceína; e liberação de cromo. Veja, em geral, Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994, que é aqui incorporado como referência. Em adição ao acima, veja Publicação de Patente U.S. Publicada de Número 20030224487, (Sprecher, Cindy et al., 2003) para um exemplo de células-BaF3 expressando IL-3 IRA e OSMRbeta de comprimento total.

Métodos para preparar os polinucleotídeos codificadores dos anticorpos aqui descritos (incluindo DNA e RNA) são bem conhecidos na arte. RNA total pode ser preparado usando extração em isotiocianato de guanidínio seguida por isolamento por centrifugação em um gradiente de CsCl (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979). Poli (A)⁺ RNA é preparado a partir de RNA total usando o método de Aviv e Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-12, 1972). DNA complementar (cDNA) é preparado a partir de poli(A)⁺ RNA usando métodos conhecidos. Na alternativa, DNA genômico pode ser isolado. Polinucleotídeos codificadores de anticorpos anti-IL-31 são então identificados e isolados por, por exemplo, hibridização ou PCR.

A presente invenção também inclui moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que se ligam em fragmentos de polipeptídeos de IL-31 e moléculas de ácido nucleico codificadoras de tais fragmentos funcionais. Uma IL-31 "funcional" ou seu fragmento funcional como aqui definido é caracterizada(o) por sua atividade proliferativa ou diferenciadora, por sua capacidade para induzir ou inibir funções celulares especializadas, ou por sua capacidade para se ligar especificamente em um anticorpo anti- IL-31

ou IL-3 IRA ou anticorpo ou heterodímeros RA/OSMRbeta destes receptores (quer solúveis quer imobilizados). Como previamente aqui descrito, IL-31 é caracterizada por uma estrutura de feixe de quatro hélices compreendendo hélice A (resíduos de aminoácido 38-52), hélice B (resíduos de aminoácido 83-98), hélice C (resíduos de aminoácido 104-117) e hélice D (resíduos de aminoácido 137-152), como mostrado em SEQ ID NO:2. Assim, a presente invenção proporciona adicionalmente proteínas de fusão compreendendo: (a) moléculas de polipeptídeo compreendendo uma ou mais das hélices descritas acima; e (b) fragmentos funcionais compreendendo uma ou mais destas hélices. A outra porção do polipeptídeo da proteína de fusão pode ser contribuída por outra citocina de feixe de quatro hélices, tal como IL-15, IL-2, IL-4 e GM-CSF, ou por um peptídeo de sinal secretório não-nativo e/ou não-relacionado que facilita a secreção da proteína de fusão.

A presente invenção também proporciona moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que se ligam em fragmentos de polipeptídeo ou peptídeos compreendendo uma porção possuindo epitopo de um polipeptídeo de IL-31 aqui descrito. Tais fragmentos ou peptídeos podem compreender um "epitopo imunogênico", que é uma parte de uma proteína que induz uma resposta de anticorpo quando a proteína inteira é usada como um imunógeno. Peptídeos possuindo epitopo imunogênico podem ser identificados usando métodos padrão (veja, por exemplo, Geysen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:3998 (1983)). A ligação dos anticorpos nestes fragmentos funciona resulta em inibição, bloqueio, neutralização, e/ou redução em transdução de sinal de IL-31 sobre seu receptor cognato.

Em contraste, fragmentos de polipeptídeo ou peptídeos podem compreender um "epitopo antigênico", que é uma região de uma molécula de proteína na qual um anticorpo pode especificamente se ligar. Certos epitopos consistem de um segmento linear ou contíguo de aminoácidos, e a antigenicidade de um tal epitopo não é interrompida por agentes

desnaturantes. É sabido na arte que peptídeos sintéticos relativamente curtos que podem imitar epitopos de uma proteína podem ser usados para estimular a produção de anticorpos contra a proteína (veja, por exemplo, Sutcliffe et al., Science 219:660 (1983)). Conseqüentemente, polipeptídeos e peptídeos possuindo epitopo antigênico da presente invenção são úteis para produzir anticorpos (e.g., anticorpos neutralizadores) que se ligam nos polipeptídeos aqui descritos. Perfis de hidrofiliidade de Hopp/Woods podem ser usados para determinar regiões que têm o potencial antigênico mais alto (Hopp et al., 1981, *ibid*, e Hopp, 1986, *ibid*.). Por exemplo, em IL-31 de humano, regiões hidrofílicas incluem resíduos de aminoácido 54-59 de SEQ ID NO:2, resíduos de aminoácido 129-134 de SEQ ID NO:2, resíduos de aminoácido 53-58 de SEQ ID NO:2, resíduos de aminoácido 35-40 de SEQ ID NO:2, e resíduos de aminoácido 33-38 de SEQ ID NO:2. Por exemplo, em IL-31 de camundongo, regiões hidrofílicas incluem resíduos de aminoácido 34-39 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 46-51 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 131-136 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 158-163 de SEQ ID NO:4, e resíduos de aminoácido 157-162 de SEQ ID NO:4.

Polipeptídeos e peptídeos possuindo epitopo antigênico preferivelmente contêm pelo menos quatro a cinco aminoácidos, pelo menos dez a quatorze aminoácidos, ou cerca de quatorze a cerca de trinta aminoácidos de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4. Tais polipeptídeos ou peptídeos possuindo epitopo podem ser produzidos por fragmentação de um polipeptídeo IL-31, ou por síntese química de peptídeo, como aqui descrito. Além disso, epitopos podem ser selecionados por exibição de fago de bibliotecas de peptídeos randômicas (veja, por exemplo, Lane e Stephen. Curr. Opin. Immunol. 5:268 (1993); e Cortese *et al*, Curr. Opin. Biotechnol. 7:616 (1996)). Métodos padrão para identificar epitopos e produzir anticorpos a partir de peptídeos pequenos que compreendem um epitopo são descritos, por exemplo, por Mole, "Epitope Mapping", em Methods in Molecular

Biology. Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", em Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application. Ritter e Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), e Coligan *et al.* (eds.), Current Protocols in Immunology, páginas 9.3.1 - 9.3.5 e páginas 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

A atividade dos anticorpos como aqui descrito pode ser medida por sua capacidade para inibir, ou reduzir proliferação usando uma variedade de ensaios que medem proliferação de e/ou ligação em células expressando o receptor IL-3 IRA. De interesse particular são mudanças em células dependentes de IL-31. Linhagens celulares adequadas a serem engenhas para serem dependentes de IL-31 incluem a linhagem celular 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 M07e (Kiss *et al.*, Leukemia 7: 235-240, 1993). Linhagens celulares dependente de fator podem ser estabelecidas de acordo com métodos publicados (e.g. 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 descrita pode ser medida por um microfisiômetro de biossensor baseado em silício que mede a taxa de acidificação extracelular ou a excreção de prótons associada com ligação de receptor e subseqüentes respostas celulares fisiológicas. Um dispositivo exemplar é o Cytosensor™ Microphysiometer manufaturado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Uma variedade de respostas celulares, tal como proliferação de célula, transporte de íons, produção de energia, ativação de receptor e regulatória, e semelhante, pode ser medida por este método. Veja, por exemplo, McConnell, H.M. *et al.*, Science 257:1906-1912, 1992;

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

Antagonistas também são úteis como reagentes de pesquisa para caracterizar sítios de interação de ligante-receptor. Antagonistas são úteis para inibir expansão, proliferação, ativação, e/ou diferenciação de células envolvidas em regulação de hematopoiese. Inibidores de atividade de IL-31 (antagonistas de IL-31) incluem anticorpos anti-IL-31 e receptores de IL-31 solúveis, bem como outros agentes peptídicos e não-peptídicos (incluindo ribozimas).

Inibição da atividade de IL-31 pode ser medida por numerosos ensaios. Em adição àqueles ensaios aqui mostrados, amostras podem ser testadas para inibição de atividade de IL-31 dentro de uma variedade de ensaios projetados para medir ligação de receptor, a estimulação/inibição de respostas celulares dependentes de IL-31 ou proliferação de células expressando receptor IL-3 IRA.

Um polipeptídeo ligante de IL, incluindo moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 também pode ser usado para purificação de ligante. O polipeptídeo é imobilizado sobre um suporte sólido, tal como glóbulos de agarose, agarose reticulada, vidro, resinas celulósicas, resinas baseadas em sílica, poliestireno, poliacrilamida reticulada, ou materiais similares que são estáveis sob as condições de uso. Métodos para ligar polipeptídeos em suportes sólidos são conhecidos na arte, e incluem química de amina, ativação por brometo de cianogênio, ativação por N-hidróxi-succinimida, ativação por epóxido, ativação de sulfidril, e ativação por hidrazida. O meio resultante geralmente será configurado na forma de uma coluna, e fluidos contendo o ligante são passados através da coluna uma ou mais vezes para permitir que o ligante se ligue no polipeptídeo receptor. O ligante é então eluído usando mudanças em concentração de sal, agentes

caotrópicos (guanidina HCl), ou pH para interromper a ligação de ligante-receptor.

Um sistema de ensaio que usa um receptor ligando em ligante (ou um anticorpo, um membro de um par de complemento / anti-complemento) ou um seu fragmento de ligação, e um instrumento de biossensor comercialmente disponível (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) pode ser vantajosamente empregado. Tal receptor, anticorpo, membro de um par de complemento / anti-complemento ou fragmento imobilizado é imobilizado sobre a superfície de um chip receptor. Uso deste instrumento é mostrado por Karlsson, L Immunol. Methods 145:229-40, 1991 e Cunningham e Wells, J. Mol. Biol. 234:554-63, 1993. Um receptor, anticorpo, membro ou fragmento é covalentemente ligado, usado química de amina ou sulfidril, em fibras de dextrano que são ligadas em filme de ouro dentro da célula de fluxo. Uma amostra de teste é passada através da célula. Se um ligante, epitopo, ou membro oposto do par de complemento/anti-complemento está presente na amostra, ele se ligará no receptor, anticorpo ou membro imobilizado, respectivamente, causando uma mudança no índice de refração do meio, que é detectado como uma mudança em ressonância de plasmon de superfície do filme de ouro. Este sistema permite a determinação de associação e dissociação, das quais afinidade de ligação pode ser calculada, e avaliação de estequiometria de ligação. Alternativamente, ligação de ligante / receptor pode ser analisada usando tecnologia SELDI(TM) (CIPHERGEN, Inc., Palo Alto, CA).

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem ser usadas para bloquear a ação biológica de IL-31 pró-inflamatória e são úteis como agentes terapêuticos antiinflamatórios em uma variedade de doenças como aqui descrito. Uma pessoa experiente na arte reconhecerá que polipeptídeos possuindo epitopo, antigênico, 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 (e.g., SEQ ID NO:2). Polipeptídeos compreendendo uma porção maior de um polipeptídeo IL-31, i.e., de 30 a 100 resíduos até o comprimento inteiro da seqüência de aminoácidos estão incluídos. Epitopos imunogênicos ou
5 antígenos também podem incluir etiquetas, adjuvantes, veículos e agentes de transporte ligados, como aqui descrito. Antígenos adequados incluem o polipeptídeo IL-31 codificado por SEQ ID NO:2 do número de aminoácido 24 ao número de aminoácido 164, ou um seu fragmento de 9 a 141 aminoácidos contíguos. Outros antígenos adequados, a IL-31 de comprimento
10 total e madura IL-31, hélices A-D, e hélices individuais ou múltiplas A, B, C, e D, da estrutura de feixe de quatro hélices de IL-31, como aqui descrito. Peptídeos preferidos para uso como antígenos são peptídeos hidrofílicos tais como aqueles preditos por uma pessoa experiente na arte a partir de uma plotagem de hidrofobicidade, como aqui descrito, por exemplo, resíduos de
15 aminoácido 114-119, 101-105, 126-131, 113-118, e 158-162 de SEQ ID NO:2; e resíduos de aminoácido 34-39, 46-51, 131-136, 158-163 e 157-162 de SEQ ID NO:4. Além disso, epitopos antigênicos de IL-31 como preditos por uma plotagem de Jameson-Wolf, e.g., usando programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) servem como antígenos preferidos,
20 e são prontamente determinados por uma pessoa experiente na arte.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são consideradas em serem especificamente ligantes se: 1) exibem um nível limite de atividade de ligação, e 2) não reagem cruzadamente significativamente com moléculas de polipeptídeo relacionadas. Um nível limite de ligação é
25 determinado se moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 aqui se ligam em um polipeptídeo, peptídeo ou epitopo de IL-31 com uma afinidade pelo menos 10-vezes maior do que a afinidade de ligação em 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, more

preferivelmente 10^8 M^4 ou maior, e mais preferivelmente 10^9 M^{-1} ou maior. A afinidade de ligação de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode ser prontamente determinada por uma pessoa ordinariamente experiente na arte, por exemplo, por análise de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Se moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 não reagem cruzadamente significativamente com moléculas de polipeptídeo relacionadas é mostrado, por exemplo, pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 detectando polipeptídeo IL-31 mas não polipeptídeos relacionados não conhecidos usando uma análise padrão de Western blot (Ausubel et al., ibid.). Exemplos de polipeptídeos relacionados conhecidos são aqueles mostrados na arte anterior, tais como ortólogos, e parálogos conhecidos, e membros conhecidos similares de uma família de proteínas. Seleção também pode ser feita usando polipeptídeos mutantes de IL-31, e IL-31 de não-humano. Além disso, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem ser "selecionadas(os) contra" polipeptídeos relacionados conhecidos, para isolar uma população que especificamente se liga nos polipeptídeos IL-31. Por exemplo, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são adsorvidas em polipeptídeos relacionados aderidos em matriz insolúvel; moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 específicas(os) para IL-31 fluirão através da matriz sob condições tampão apropriadas. 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 and Sons, Inc., 1995.

Anticorpos monoclonais purificados de meios de cultura de tecido são caracterizados por sua capacidade para bloquear ou reduzir a atividade de ligação de receptor ("ensaio de neutralização") de huIL-31 recombinante purificada sobre células-BaF3/MPL-IL-31.

Afinidade de ligação das moléculas ligantes de IL-31 e antagonista de OL-31 pode ser determinada. Anticorpo de Cabra Específico para Anti-IgG-Fc gama de Rato (Jackson) é imobilizado sobre um chip CM5 Biacore. O ensaio é otimizado para ligar cada mAb sobre superfície de
5 captura de anti-Rato e então uma série de concentrações de IL-31 é injetada através de mAb para ver associação (K_a) e dissociação (K_d). Após cada corrida, a superfície é regenerada de volta para o Anticorpo de Anti-Rato com 2 injeções de HCl 20mM. Dados são gerados para cada e programa de computador de avaliação (BIAevaluation software version 3.2, Pharmacia
10 BIAcore, Uppsala, Suécia) é usado para avaliar a cinética da ligação de anticorpo anti-IL-31 na proteína IL-31.

As seqüências de polinucleotídeo e de polipeptídeo das regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada de clones de números 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5,
15 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4, 292.72.3.1. foram determinadas como mostrado em Exemplo 1. As seqüências de polipeptídeo de terminação amino das regiões variáveis de cadeias leve e pesada de números de clones foram determinadas como mostrado em Exemplo 2.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 em
20 meios de cultura de tecido são caracterizadas por sua capacidade para bloquear, inibir, prevenir, ou reduzir ligação de receptor quando crescido na presença das proteínas recombinantes purificadas IL-31 de humano. Por exemplo, as moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem ser caracterizadas em numerosas maneiras incluindo *binning* (i.e, determinação
25 de se cada anticorpo poderia inibir a ligação de qualquer outra ligação), afinidade relativa, e neutralização.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 geradas pelos métodos aqui descritos podem ser testadas para neutralização por uma variedade de métodos. Por exemplo o ensaio de luciferase como descrito em

Pedido de Patente U.S. Publicado (veja número de publicação 20030224487, Sprecher, Cindy et al., 2003) pode ser usado. Em adição neutralização pode ser testada por medição de um decréscimo na produção de quimiocinas pró-inflamatórias tais como TARC e MDC de culturas de queratinócito na
 5 presença de ligante e do anticorpo monoclonal. Neutralização também pode ser medida pelos modelos *in vivo* aqui descritos.

Em uma modalidade, as moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 da presente invenção são fragmentos de anticorpo de ligação em antígeno de humano da presente invenção e incluem, mas não são
 10 limitados a, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, FVs ligados por dissulfeto (sdFv) e fragmentos compreendendo quer um domínio VL quer um domínio VH. Fragmentos de anticorpo ligantes de antígeno, incluindo anticorpos de cadeia única, podem compreender a(s) região(ões) variável(eis) (i.e., SEQ ID NO: 1, 2, 3, ou 4) sozinha(s) ou em
 15 combinação com a totalidade ou uma porção das seguintes: região de dobradiça, domínios C_{H1}, C_{H2}, e C_{H3}. Também estão incluídos na invenção fragmentos ligantes em antígeno também compreendendo qualquer combinação de região(ões) variável(eis) com uma região de dobradiça, domínios C_{H1}, C_{H2}, e C_{H3}.

Em outra modalidade, as moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 da presente invenção podem ser monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas ou de multiespecificidade maior. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epitopos diferentes de um polipeptídeo da presente invenção ou podem ser específicos para ambos um
 25 polipeptídeo da presente invenção bem como para epitopo heterólogo, tal como polipeptídeo heterólogo ou material de suporte sólido. Veja, e.g., Publicações PCT de WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); Pat. U.S. Nos. 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 moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 geneticamente alteradas(os) que são funcionalmente equivalentes às moléculas ligantes de IL-31 ou aos antagonistas de IL-31 descritas(os) acima. Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 modificadas(os) proporcionando estabilidade e/ou eficácia terapêutica melhoradas são preferidas(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 significativamente deletariamente a utilidade de ligação em antígeno. Substituições podem variar de mudança ou modificação de um ou mais resíduos de aminoácido a reprojeto completo de uma região desde que a utilidade terapêutica seja mantida. Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 da presente invenção podem ser modificadas(os) após tradução (e.g., acetilação, e fosforilação) ou podem ser sinteticamente modificadas(os) (e.g., a ligação de um grupo marcador).

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 também incluem anticorpos quiméricos ou fragmentos quiméricos, compreendendo uma região variável como aqui descrito e uma região constante derivada de um humano de tal modo que o anticorpo quimérico ou fragmento quimérico tenha uma meia-vida mais longa, e seja menos imunogênico quando administrado a um sujeito humano. O método de preparar anticorpos quiméricos e fragmentos quiméricos é conhecido na arte. As regiões variáveis destas moléculas ligantes de IL-31 ou destes antagonistas de IL-31 podem ser conectadas com uma região constante de uma IgG de humano para formar o anticorpo quimérico desejado. Uma molécula IgG Fc pode ser fusionada nas moléculas ligantes de IL-31. Para evitar indução de função efetora, a molécula IgG Fc pode ser de uma molécula IgG4 Fc. Assim, as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis e as regiões variáveis com

aqui mostradas podem ser usadas para gerar anticorpos quiméricos sendo que a região constante é uma molécula IgG de humano e as regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada podem ser selecionadas daquelas de clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 5 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4, e 292.72.3.1. Tais anticorpos quiméricos teriam: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a 10 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; d) uma 15 região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de 20 aminoácidos de SEQ ID NO: 17; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia 25 pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; ou j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e seriam usados conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

Tais regiões variáveis também podem ser geradas com ou sem as seqüências de sinal. Assim, as seqüências de aminoácido das regiões variáveis e as regiões variáveis como aqui mostradas podem ser usadas para gerar anticorpos quiméricos sendo que a região constante é uma molécula IgG de humano e as regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada podem ter uma seqüência de sinal e podem ser selecionadas daquelas de clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4, e 292.72.3.1. Tais anticorpos quiméricos teriam: a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; b) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:4; c) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; d) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; e) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; f) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a

seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; g) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; h) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; i) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; ou j) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 e seriam usados conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Tais regiões variáveis podem ser geradas com ou sem as seqüências de sinal.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 incluem versão humanizada das moléculas ligantes de IL-31 ou dos antagonistas de IL-31 aqui descritos. Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 humanizadas(os) compreendem CDRs de uma imunoglobulina doadora de camundongo e moldes de cadeia leve e de cadeia pesada de uma imunoglobulina aceptora de humano. O método de preparação de anticorpo humanizado é descrito em Pat. U.S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; e 6.180.370 (cada uma das quais é aqui incorporada em sua totalidade como referência). As CDRs destes anticorpos podem ser então graftizadas em quaisquer moldes de humano selecionados, que são conhecidos na arte, para gerar o anticorpo humanizado derivado.

A invenção também proporciona moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que competitivamente inibem a ligação de um

anticorpo monoclonal em um polipeptídeo da invenção, preferivelmente o polipeptídeo de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4. Inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na arte, por exemplo, usando os ensaios de ligação competitiva aqui descritos. Em modalidades 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% no polipeptídeo de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

A invenção também proporciona moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que competitivamente inibem a ligação de um anticorpo e um epítipo da invenção como determinado por qualquer método conhecido na arte para determinar ligação competitiva, por exemplo, os imunoenaios aqui descritos. Em modalidades preferidas, o anticorpo competitivamente inibe a ligação em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50%.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 da presente invenção incluem derivados que são modificados, por exemplo, mas não por meio de limitação, os derivados incluem moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que têm sido modificadas(os), e.g., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação por grupos bloqueadores / protetores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação em um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das numerosas modificações químicas pode ser realizada por 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.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 da presente invenção também incluem moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que têm meias-vidas (e.g., meias-vidas séricas) em um

mamífero, preferivelmente um humano, de maior do que 15 dias, preferivelmente maior do que 20 dias, maior do que 25 dias, maior do que 30 dias, maior do que 35 dias, maior do que 40 dias, maior do que 45 dias, maior do que 2 meses, maior do que 3 meses, maior do que 4 meses, ou maior do que 5 meses. As meias-vidas aumentadas dos anticorpos da presente invenção ou dos fragmentos dos mesmos em um mamífero, preferivelmente um humano, resultam em um título sérico mais alto de ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo no mamífero, e assim, reduz a frequência da administração de ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo e/ou reduz a concentrações de ditos anticorpos ou fragmentos de anticorpo a serem administrados.

As meias-vidas in vivo das moléculas ligantes de IL-31 ou dos antagonistas de IL-31 podem ser aumentadas pela modificação (e.g., substituição, deleção ou adição) de resíduos de aminoácido identificados como envolvidos na interação entre o domínio Fc e o receptor FcRn (veja, e.g., Publicações Internacionais Nos. WO 97/34631 e WO 02/060919, que são aqui incorporadas como referências em suas totalidades), ou por ligação de moléculas de polímero tal como poli(etileno-glicol) (PEG) de peso molecular alto. PEG pode ser ligado com ou sem um *linker* multifuncional quer através de conjugação sítio-específica do PEG na terminação-N- ou -C de tidos anticorpos ou fragmentos de anticorpo quer via grupos epsilon-amino presentes em resíduos de lisina. Derivação de polímero linear ou ramificado que resulta em perda mínima de atividade biológica será usada. O grau de conjugação será rigorosamente monitorado por SDS-PAGE e espectrometria de massa para garantir conjugação apropriada de moléculas de PEG nos anticorpos. PEG não reagido pode ser separado dos conjugados de anticorpo-PEG por, e.g., cromatografia de troca iônica ou de exclusão de tamanho.

É entendido que as moléculas ligantes de IL-31 humanizadas ou os antagonistas de IL-31 humanizados projetadas(os) pelo presente método

podem ter substituições de aminoácido conservativas adicionais que substancialmente não têm efeito sobre a ligação em antígeno ou outras funções de imunoglobulina. Para substituições conservativas são intencionadas as combinações tais como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gin; ser, thr; lys, arg; e phe, tyr.

Métodos para humanizar anticorpos de não-humano são bem conhecidos na arte. Geralmente, imunoglobulinas humanizadas, incluindo anticorpos humanizados, têm sido construídas por meio de engenharia genética. As imunoglobulinas humanizadas que têm sido descritas (Jones et al., op. cit; Verhoeyen et al., op. cit; Riechmann et al., op. cit.) têm compreendido em sua maioria um molde que é idêntico ao molde de uma cadeia de imunoglobulina de humano particular, a aceptora, e as três CDR's de uma cadeia de imunoglobulina doadora de não-humano. Especificamente, anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de anticorpos de espécies não-humanas que se ligam no antígeno desejado tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da espécie não-humana e regiões de molde de uma molécula de imunoglobulina de humano.

A presente invenção inclui critérios pelos quais um número limitado de aminoácidos no molde de uma cadeia de imunoglobulina humanizada são escolhidos para serem iguais aos aminoácidos naquelas posições na doadora em vez de na aceptora, com o propósito de aumentar a afinidade do anticorpo compreendendo a cadeia de imunoglobulina humanizada.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 da presente invenção são geradas(os) baseado em parte no modelo que duas causas contribuidoras da perda de afinidade em meios anteriores de produção de anticorpos humanizados (usando como exemplos anticorpos de camundongo como a fonte de as CDR's) são:

(1) Quando as CDR's de camundongo são combinadas com

molde de humano, os aminoácidos do molde próximos das CDR's se tornam de humano em vez de camundongo. Sem intenção de se ligar à teoria, estes aminoácidos mudados podem distorcer ligeiramente as CDR's, porque criam forças hidrofóbicas ou eletrostáticas diferentes do que no anticorpo de camundongo doador, e as CDR's distorcidas podem não fazer contatos efetivos com o antígeno como as CDR's o faziam no anticorpo doador; e

[71] (2) Aminoácidos no anticorpo de camundongo original que estão próximos das, mas não são parte das, CDR's (i.e., ainda parte do molde), podem fazer contatos com o antígeno que contribui para afinidade.

Estes aminoácidos não perdidos quando o anticorpo é humanizado, porque todos os aminoácidos de molde são tornados de humano.

Para evitar estes problemas, e para produzir anticorpos humanizados que têm uma afinidade forte por um antígeno desejado, a presente invenção usa um ou mais dos seguintes princípios para projetar imunoglobulinas humanizadas. Também, os critérios podem ser usados individualmente, ou quando necessário em combinação, para alcançar a afinidade desejada ou as características almejadas.

Um princípio é que como acceptor, um molde é usado de uma imunoglobulina de humano particular que é incomumente homóloga à imunoglobulina doadora a ser humanizada, ou uso de um molde de consenso de muitos anticorpos de humano. Por exemplo, comparação da sequência de uma região variável de cadeia pesada (ou leve) de camundongo contra regiões variáveis de cadeia pesada (ou leve) de humano em um banco de dados (por exemplo, o National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource) mostra que a extensão de homologia para regiões de humano diferentes varia grandemente, tipicamente de cerca de 40% a cerca de 60-70%. Pela escolha como imunoglobulina acceptora uma das regiões variáveis de cadeia pesada (respectivamente leve) de humano que é mais homóloga à região variável de cadeia pesada (respectivamente leve) da imunoglobulina

doadora, menos aminoácidos serão mudados ao se ir da imunoglobulina doadora para a imunoglobulina humanizada. Conseqüentemente, e de novo sem intenção de se ligar a teoria, é crido que há uma chance menor de mudança de um aminoácido próximo de CDR's que distorce sua conformação.

- 5 Além disso, a forma total precisa de um anticorpo humanizado compreendendo a cadeia de imunoglobulina humanizada pode se parecer mais exatamente à forma do anticorpo doador, também reduzindo a mudança de distorção de CDR's.

- 10 Tipicamente, uma das 3-5 seqüências de região variável de cadeia pesada mais homólogas em uma coleção representativa de pelo menos cerca de 10 a 20 cadeias pesadas de humano distintas será escolhida para proporcionar o molde de cadeia pesada, e similarmente para a cadeia leve. Preferivelmente, uma das 1-3 regiões variáveis mais homólogas será usada. A imunoglobulina aceptora selecionada mais preferivelmente terá pelo menos
15 cerca de 65% de homologia na região de molde em relação à imunoglobulina doadora.

- Em muitos casos, pode ser considerado preferível usar cadeias leves e pesadas do mesmo anticorpo de humano como seqüências aceptoras, para se ter garantia que as cadeias leves e pesadas de humano farão contatos
20 favoráveis umas com as outras. Neste caso, as cadeias leve e pesada doadoras serão comparadas apenas contra cadeias de anticorpos humanizados cuja seqüência completa é conhecida, e.g., os anticorpos Eu, Lay, Pom, Wol, Sie, Gal, Ou e WEA (Kabat et al., op. cit; ocasionalmente, os últimos poucos aminoácidos de uma cadeia de humano não são conhecidos e precisam ser
25 deduzidos por homologia a outros anticorpos de humano). O anticorpo de humano será escolhido no qual as seqüências de regiões de variáveis de cadeias leve e pesada, tomadas juntas, são no todo mais homólogas às seqüências de região variável de cadeias leve e pesada doadoras. Algumas vezes peso maior serão então dados à seqüência de cadeia pesada. O anticorpo

de humano escolhido então proporcionará ambas seqüências aceptoras de cadeias leve e pesada. Na prática, é muitas vezes verificado que o anticorpo Eu de humano servira para este papel.

De acordo com o método "de melhor-ajuste", a seqüência de domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada contra a biblioteca inteira de seqüências de domínio variável de humano. A seqüência de humano que está mais próxima daquela do roedor é então aceita como o modelo (FR) de humano para anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Outro método usa um molde particular derivado da seqüência de consenso de todos os anticorpos de humano de um grupo particular de cadeias leves ou pesadas. O mesmo molde pode ser usado para vários 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 aceptora é escolhida, afinidade mais alta pode ser alcançada por seleção de um número pequeno de aminoácidos no molde da cadeia de imunoglobulina humanizada que são iguais aos aminoácidos naquelas posições na doadora em vez de na aceptora. Muitas vezes, resíduos de molde nas regiões de molde de humano serão substituídas pelo resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR donor para alterar, preferivelmente melhoras, ligação em antígeno. Estas substituições de molde são identificadas por métodos bem conhecidos na arte, e.g., por modelagem, das interações dos resíduos de molde e CDR para identificar resíduos de molde importantes para ligação em antígeno e comparação de seqüência para identificar resíduos de molde incomuns em posições particulares. (Veja, e.g., Queen et al., Pat. U.S. No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), que são aqui incorporadas como referências em suas totalidades). Anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas na arte, incluindo, por exemplo,

graftização de CDR (EP 239.400; Publicação PCT WO 91/09967; Pat. U.S. Nos. 5.225.539; 5.530.101; e 5.585.089), revestimento de "folheado" (*veneering*) ou renovação de superfície (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 rearranjo de cadeia (Pat. U.S. No. 5.565.332). Conformemente, tais anticorpos "humanizados", são anticorpos quiméricos (Pat. U.S. No. 4.816.567) sendo que substancialmente menos do que um domínio variável de humano intacto tem sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não-humana.

Anticorpos humanizados geralmente tem pelo menos três vantagens potenciais sobre camundongo ou em alguns casos anticorpos quiméricos para uso em terapia de humano:

(1) Devido ao fato de a porção efetora ser de humano, pode interagir melhor com as outras partes do sistema imune de humano (e.g., destruir as célula alvo mais eficientemente por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)).

(2) O sistema imune de humano não deve reconhecer a região constante ou de molde do anticorpo humanizado como estranha, 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.

(3) Anticorpos de camundongo injetados têm sido relatados em terem uma meia-vida em circulação humana muito mais curta do que a meia-vida de anticorpos normais (D. Shaw et al., J. Immunol., 138, 4534-4538 (1987)). Anticorpos humanizados injetados presumivelmente terão uma meia-vida mais similar à dos anticorpos de humano naturalmente ocorrentes, permitindo que doses menores e menos freqüentes sejam dadas.

Em um aspecto, a presente invenção é direcionada ao projeto de anticorpos humanizados que são produzidos pela expressão de segmentos de DNA recombinante codificadores de CDR's de cadeias pesada e leve de uma imunoglobulina doadora capaz de ligação em um antígeno desejado, tal como IL-31. ligados em segmentos de DNA codificador de regiões de molde de humano aceptoras.

Os segmentos de DNA tipicamente adicionalmente incluirão uma seqüência de DNA de controle de expressão operacionalmente ligada nas seqüências codificadoras de imunoglobulina humanizada, incluindo regiões de promotor naturalmente associadas ou heterólogas. As seqüências de controle de expressão serão sistemas de promotor eucariótico em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, mas seqüências de controle para hospedeiros procarióticos também podem ser usadas. Uma vez o vetor tenha sido incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão em nível alto das seqüências de nucleotídeos, e, como desejado, a coleção e a purificação das cadeias leves humanizadas, cadeias pesadas humanizadas, dímeros de cadeias leve/pesada humanizados ou anticorpos intactos humanizados, fragmentos de ligação ou outras formas de imunoglobulina podem seguir (veja, S. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979), que é aqui incorporada como referência). As moléculas anti-IL31 podem ser preparadas pela expressão em células hospedeiras de mamífero, tais como células de Ovário de Hamster Chinês, e células HEK 293F, por exemplo.

Seqüências de DNA de região constante de humano podem ser isoladas de acordo com procedimentos bem conhecidos de uma variedade de células de humano, mas preferivelmente células-B imortalizadas (veja, 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 no antígeno predeterminado, 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. Células fonte adequadas para as seqüências de DNA de molde e de região constante, e células hospedeiras para secreção e expressão de imunoglobulina, podem ser obtidas de numerosas fontes, tal como a American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", sexta edição (1988) Rockville, Md. U.S.A., que é aqui incorporada como referência).

Em adição às imunoglobulinas humanizadas especificamente aqui descritas, outras imunoglobulinas modificadas "substancialmente homólogas" às seqüências nativas podem ser prontamente projetadas e manufaturadas utilizando várias técnicas de DNA recombinante bem conhecidas por aqueles pessoas experientes na arte. Regiões de molde de humano diferentes variadas podem ser usadas individualmente ou em combinação como uma base para as imunoglobulinas humanizadas da presente invenção. Em geral, modificações dos genes podem ser prontamente realizadas por uma variedade de técnicas bem conhecidas, tal como mutagênese sítio-direcionada (veja, Gillman e Smith, *Gene*, 8, 81-97 (1979) e S. Roberts et al., *Nature*, 328, 731-734 (1987), ambas as quais são aqui incorporadas como referências).

Os anticorpos humanizados da invenção incluem fragmentos bem como anticorpos intactos. Tipicamente, estes fragmentos competem com o anticorpo intacto do qual foram derivados pela ligação em antígeno. Os fragmentos tipicamente ligam com uma afinidade de pelo menos 10^7 M^{-1} , e mais tipicamente 10^8 ou 10^9 M^{-1} (i.e., dentro das mesmas faixas que as do anticorpo intacto). Fragmentos de anticorpo humanizado incluem Fab, Fab' F(ab')₂, e Fv de cadeias pesadas, cadeias leves separadas. Fragmentos são produzidos por técnicas de DNA recombinante, ou por separação enzimática

ou química de imunoglobulinas intactas.

Para outros detalhes em humanização de anticorpos, veja Patentes Européias Nos. EP 239.400, EP 592.106, e EP 519.596; Publicações Internacionais Nos. WO 91/09967 e WO 93/17105; Pat. U.S. Nos. 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: 1119-125; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13: 353-60; Morea et al., 2000, *Methods* 20: 267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73; 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 têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos eram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, e.g., Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) e Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Contudo, estes fragmentos agora podem ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente copulados para formarem fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o praticante experiente. Ademais, exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir FVs de cadeia única e anticorpos incluem aquelas descritas em

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).

5 A presente invenção inclui anticorpos recombinantemente fusionados ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações tanto covalentes quanto não covalentes) em um polipeptídeo (ou sua porção, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção para gerar proteínas de fusão. Assim, a invenção também se refere aos imunoconjugados compreendendo o anticorpo aqui descrito
10 conjugado em um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (e.g. uma toxina enzimaticamente ativa, de origem bacteriana, fúngica, de planta ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioativo (i.e., um radioconjugado).

A presente invenção inclui anticorpos recombinantemente
15 fusionados ou quimicamente conjugados (incluindo ambas conjugações covalente e não-covalente) em um polipeptídeo (ou sua porção, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção para gerar proteínas de fusão. A fusão não necessariamente precisa ser direcionada, mas pode ocorrer através de seqüências *linker*. Os
20 anticorpos podem ser específicos para antígenos diferentes de outros polipeptídeos (ou sua porção, preferivelmente pelo menos 10, 20 ou 50 aminoácidos do polipeptídeo) da presente invenção. Por exemplo, anticorpos podem ser usados para selecionar os polipeptídeos da presente invenção para tipos de célula particulares, quer *in vitro* quer *in vivo*, por fusão ou
25 conjugação dos polipeptídeos da presente invenção em anticorpos específicos para receptores de superfície celular particulares. Anticorpos fusionados ou conjugados nos polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em imunoensaios *in vitro* e métodos de purificação usando métodos conhecidos na arte. Veja e.g., 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 em suas totalidades como referências.

5 A presente invenção adicionalmente inclui composições compreendendo os polipeptídeos da presente invenção (e.g., aqueles compreendendo um epítipo antigênico ou imunogênico) fusionados ou conjugados em seqüências de polipeptídeo heterólogas (e.g., domínios de anticorpo diferentes de regiões variáveis). Por exemplo, os polipeptídeos da
10 presente invenção podem ser fusionados ou conjugados em uma região Fc de anticorpo, ou sua porção. Por exemplo, polipeptídeos da presente invenção (incluindo fragmentos ou suas variantes), podem ser fusionados com o domínio constante de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), ou suas porções (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, ou qualquer sua combinação e suas porções, resultando em
15 polipeptídeos quiméricos. A porção de anticorpo fusionada em um polipeptídeo da presente invenção pode compreender a região constante, região de dobradiça, domínio C_{H1}, domínio C_{H2}, e domínio C_{H3} ou qualquer combinação de domínios inteiros ou suas porções. Os polipeptídeos também podem ser fusionados ou conjugados em porções de anticorpo acima para
20 formar multímeros. Por exemplo, porções Fc fusionadas nos polipeptídeos da presente invenção podem formar dímeros através de ligação de dissulfeto entre as porções Fc. Formas multiméricas superiores podem ser preparadas pela fusão dos polipeptídeos em porções de IgA e IgM. Métodos de fusão ou conjugação dos polipeptídeos da presente invenção em porções de anticorpo
25 são conhecidos na arte. Veja, e.g., Pat. U.S. Nos. 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)

(ditas referências incorporadas em suas totalidades como referências). Por meio de outro exemplo não limitante, polipeptídeos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos ou suas variantes) podem ser fusionados com albumina (incluindo mas não limitada à albumina sérica recombinante de humano ou fragmentos ou suas variantes (veja, e.g., Pat. U.S. No. 5.876.969, publicada aos 2 de Março de 1999, Patente EP 0.413.622, e Pat. U.S. No. 5.766.883, publicada aos 16 de Junho de 1998, aqui incorporadas em suas totalidades como referências)). Polipeptídeos e/ou anticorpos da presente invenção (incluindo fragmentos ou suas variantes) podem ser fusionados em extremidade quer N-terminal quer C-terminal da proteína heteróloga (e.g., polipeptídeo Fc de imunoglobulina ou polipeptídeo de albumina sérica de humano). Polinucleotídeos codificadores de proteínas de fusão da invenção também estão incluídas na invenção.

Como discutido acima, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fusionados ou conjugados nas porções de anticorpo acima para aumentar a meia-vida in vivo dos polipeptídeos ou para uso em métodos de imunoensaio conhecidos na arte. Ademais, os polipeptídeos da presente invenção podem ser fusionados ou conjugados nas porções de anticorpo acima para facilitar purificação. Um exemplo relatado descreve proteínas quiméricas consistindo dos dois primeiros domínios do polipeptídeo CD4 de humano e vários domínios das regiões constantes das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas de mamífero. (Veja, e.g., EP 394.827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). Liberação aumentada de um antígeno através da barreira epitelial no sistema imune tem sido demonstrada para antígenos (e.g., insulina) conjugados em um parceiro de ligação FcRn tal como fragmentos Fc ou IgG (veja, e.g., Publicações PCT WO 96/22024 e WO 99/04813). Os polipeptídeos da presente invenção fusionados ou conjugados em um anticorpo tendo estruturas diméricas ligadas por 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 sozinha(o). (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 diagnose, e assim pode resultar em, por exemplo, propriedades farmacêuticas melhoradas. (EP A 232.262). Alternativamente, deleção da parte Fc após a proteína de fusão ter sido expressada, detectada, e purificada, seria desejada. Por exemplo, a porção Fc pode impedir terapia e diagnose se a proteína de fusão é usada como um antígeno para imunizações. Em descoberta de droga, por exemplo, proteínas de humano, tal como hIL-5, têm sido fusionadas com porções Fc para o propósito de ensaios de seleção de produtividade alta para identificar antagonistas de f hIL-5. (Veja, D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995)). Tais técnicas também incluem, mas não são limitadas ao, uso de agentes de conjugação bifuncionais (veja e.g., Pat. U.S. Nos. 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; cujos conteúdos de cada uma são aqui incorporados em suas totalidades como referências).

Além disso, os polipeptídeos da invenção (e.g., anticorpos ou seus fragmentos) podem ser fusionados para preparar seqüências, tal como um peptídeo para facilitar sua purificação. Em uma outra modalidade, ácidos nucleicos codificadores dos polipeptídeos da invenção (incluindo, mas não limitados aos ácidos nucleicos codificadores de epitopos imunogênicos e/ou antigênicos) também podem ser recombinados com um gene de interesse como uma etiqueta de epitopo (e.g., a etiqueta hemaglutinina ("HA") ou a etiqueta bandeira) para ajudar em detecção e purificação do polipeptídeo expressado. Em modalidades preferidas, a seqüência de aminoácidos de marcador é um peptídeo de hexa-histidina, tal como a etiqueta proporcionada em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311), dentre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis.

Como descrito em Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por exemplo, hexa-histidina proporciona a purificação conveniente da proteína de fusão. Outras etiquetas de peptídeo para purificação incluem, mas não são limitadas a, à etiqueta "HA", que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) e a etiqueta "bandeira".

A presente invenção adicionalmente inclui moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 conjugadas(os) em um agente diagnóstico ou terapêutico. As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 podem ser usadas(os) diagnosticamente para, por exemplo, monitorar o desenvolvimento ou a progressão de um tumor como parte de um procedimento de teste clínico para, e.g., determinar a eficácia de um dado regime de tratamento, diagnose, detecção, e/ou prevenção. Detecção pode ser facilitada por copulação do anticorpo em uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais emissores de pósitron usando várias tomografias de emissão de pósitron, e íons de metal paramagnético não-radioativo. Veja, por exemplo, Pat. U.S. No. 4.741.900 para íons de metal que podem ser conjugados em anticorpos para uso como diagnósticos de acordo com a presente invenção. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de grupo prostético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína- isotiocyanato, rodamina, diclorotriazinil-amina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; 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 .

Ademais, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem ser conjugadas(os) em um grupo terapêutico tal como uma citotoxina, e.g., um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um íon de metal radioativo. Uma citotoxina ou um agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para células. Exemplos incluem paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vimblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidróxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos. Agentes terapêuticos incluem, mas não são limitados a, antimetabólitos (e.g., metotrexato, 6-mercapto-purina, 6-tio-guanina, citarabina 5-fluoro-uracila decarbazina), agentes de alquilação (e.g., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclo-tosfamida, busulfan, dibromo-manitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-dicloro-diamina-platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (e.g., daunorubicina (outrona daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (e.g., dactinomicina (outrona actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (e.g., vincristina e vimblastina).

Os conjugados da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica, o agente terapêutico ou grupo de droga não é para ser entendido como limitado aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, o grupo droga pode ser uma proteína ou um polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria; uma proteína tal como fator de necrose tumoral; α -interferon, β -interferon, fator de crescimento de nervo, fator de crescimento derivado de plaqueta, ativador de plasminogênio de tecido, um

agente trombótico ou um agente anti-trombótico, e.g., angiostatina ou endostatina; ou, modificadores de resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulante de colônias de macrofases de granulócitos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônias de granulócito ("G-CSF"), ou outros fatores de crescimento.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 também pode ser ligadas(os) em 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, poli(cloreto de vinila) ou polipropileno.

Técnicas para conjugar tal grupo terapêutico em anticorpos são bem conhecidos, veja, e.g., 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* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel 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 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, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem ser conjugadas(os) em um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo como descrito por Segal em Pat. U.S. No. 4.676.980, que é aqui incorporada como referência em sua totalidade.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31, com ou sem um grupo terapêutico conjugado nelas (neles), administradas(os) sozinhas(os) ou em combinação com fator(es) citotóxico(s) e/ou citocina(s) podem ser usadas(os) como um agente terapêutico.

5 Uma variedade de ensaios conhecidos por aqueles pessoas experientes na arte pode ser utilizada para detectar ligação de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 em polipeptídeos ou proteínas IL-31. Ensaio exemplares são descritos em detalhe em Antibodies: A Laboratory Manual. Harlow e Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Exemplos representativos de tais ensaios incluem: imunoelctroforese concorrente, radioimunoensaio, radioimuno-precipitação, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), ensaio dot blot ou Western blot, ensaio de inibição ou competição, e ensaio de sanduíche. Em adição, anticorpos podem ser selecionados para ligação em polipeptídeo ou proteína
10 IL-31 mutante versus de tipo selvagem.
15

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 to IL-31 podem ser usadas(os) para etiquetar células que expressam IL-31; para isolar IL-31 por purificação por afinidade; para ensaios diagnósticos para determinar níveis circulantes de polipeptídeos IL-31; para detectar ou
20 quantificar IL-31 solúvel como um marcador de doença ou patologia subjacente; em métodos analíticos empregando FACS; para selecionar bibliotecas de expressão; para gerar anticorpos anti-idiotípicos; e como anticorpos neutralizadores ou como antagonistas para bloquear atividade de IL-31 *in vitro* e *in vivo*. Marcadores ou etiquetas diretos(as) adequados(as)
25 incluem radionuclídeos, enzimas, substratos, cofatores, inibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminescentes, partículas magnéticas e semelhante; marcadores ou etiquetas indiretos(as) podem retratar o uso de biotina-avidina ou de outros pares de complemento / anti-complemento como intermediários. Anticorpos aqui também podem ser direta

ou indiretamente conjugados em drogas, toxinas, radionuclídeos e semelhante, e estes conjugados usados para aplicações terapêuticas ou diagnósticas *in vivo*. Além disso, anticorpos para IL-31 ou seus fragmentos podem ser usados *in vitro* para detectar IL-31 desnaturada ou seus fragmentos em ensaios, por exemplo, Western Blots ou outros ensaios conhecidos na arte.

A escolha do domínio Fc pode ter implicações sobre (i) as funções efectoras do anticorpo (ligação de FcγR (ADCC) / ligação de C1q (CDC)) e efeitos colaterais potencialmente associados, (ii) suas propriedades farmacocinéticas (ligação de FcRn) incluindo meia-vida, e (iii) possivelmente sobre depuração de complexo imune. A(s) função(ões) efetora(s) do domínio Fc inclui (incluem) fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, regulação de produção de anticorpo, e o mais importante citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC). O grau com o qual qualquer uma destas funções efectoras são induzidas depende da interação do domínio Fc com os mediadores de proteína relevantes, C1q e os receptores Fcγ, e difere dependendo das regiões constantes (Fc) de subclasse de IgG e sua interação com estas proteínas.

O domínio Fc de IgG1 interage com FcγRI, FcγRIIa, e FcγRIII sobre as células efectoras de sistema imune. O papel preciso de receptores Fcγ diferentes permanece para ser elucidado mas FcγRIIIA é considerado em se o receptor mediador de ADCC mais importante expressado primariamente sobre células NK mas também monócitos e macrófagos. IgG1 também se liga em C1q e pode acionar CDC que é mediada principalmente por células NK expressando FcγRIII. Veja Gessner, J.E., et al., "The IgG Fc Receptor Family", Ann. Hematol. 1998 Jun;76(6): 231-248. O domínio IgG4 Fc tem basicamente reduzido afinidade de ligação por C1q e receptores Fcγ diferentes, correspondendo às ADCC e CDC reduzidas. Por exemplo, Sharma et al. examinaram uma comparação direta de um IgG1 mAb e seu derivado

IgG4, cada um com regiões variáveis idênticas que selecionaram CD4. Ambos mAbs diminuíram expressão de CD4 em níveis de dose iguais e tiveram propriedades farmacocinéticas equivalentes, mas a forma de IgG1 mostrou um efeito de ADCC mais potente. Veja Sharma A., et al.,
 5 "Comparative pharmacodynamics of keliximab and clenoliximab in transgenic mice bearing human CD4". J Pharmacol Exp Ther. 2000 Apr;293(1):33-41.

A afinidade de ligação de IgG4 mAb negativo efector é grandemente reduzida se não foi abolida quando comparado com outros
 10 mAbs de isótipos IgG. Contudo, a capacidade para interagir com o receptor Brambell (FcRn) é mantida em IgG4 afetando assim a farmacocinética do mAb de isótipo IgG4 através de uma meia-vida aumentada. Enquanto IgG1 mostre geralmente atividade alta para ambas ADCC e CDC, IgG4 é considerada como tendo atividade baixa ou nula de ADCC ou CDC.

Vários exemplos de mAbs de isótipo IgG4 estão quer no mercado, em uso clínico quer em vários estágios de pesquisa e desenvolvimento. Estes mAbs terapêuticos são desenvolvidos para uma variedade de indicações em oncologia, autoimunidade & inflamação bem como em terapia anti-viral.

Como relatado por Aalberse et al. (Veja Aalberse RC, Schuurman, J. "IgG4 breaking the rules", Immunology 2002, 105: 9-19), (IgG4) de humano existe em duas formas moleculares devido à heterogeneidade de suas pontes de dissulfeto de inter-cadeias pesadas na região de dobradiça em uma porção de IgG4 de humano secretada. Esta
 25 heterogeneidade é apenas revelada sob condições não-redutoras, de desnaturação nas quais um "meio-anticorpo" HL é detectado, um fenômeno não visto em outros isótipos IgG de humano. Taylor relata que fenômenos artificiais durante manuseio de amostra tais *scrambling* de dissulfeto e reoxidação de dissulfeto sob exposição a redutor podem contribuir para a

quantidade de semi-anticorpo presente (Taylor FR, et al., "Suppression of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Sample Preparation Artifacts for Analysis of IgG4 Half-Antibody". Analytical Biochemistry 2006, 353: 204-208). Sob condições nativas, interações não covalentes garantem que o anticorpo é mantido junto como o tetrâmero H2L2. Não obstante, IgG4 tem sido relatada em heterodimerizar com outras moléculas de IgG4 em circulação. Análise das seqüências de dobradiça que conectam o F[ab] e a porção Fc do anticorpo de cadeias pesadas de IgG de humano sugere que a presença de serina em resíduo 241 pode ser a causa desta heterogeneidade: a região de dobradiça de IgG4 contém uma seqüência Cys-Pro-Ser-Cys em vez de uma seqüência Cys-Pro-Pro-Cys em IgG1. Mudança de serina em 241 para prolina (encontrada naquela posição em IgG1 e IgG2) em cadeia quimérica de humano/camundongo leva à produção de um anticorpo homogêneo e abole a heterogeneidade. Ademais, a IgG4 variante tem significativamente estendido a meia-vida sérica e mostra uma distribuição em tecido melhorada comparada com a IgG4 quimérica original.

Moléculas detectáveis adequadas podem ser direta ou indiretamente ligadas no polipeptídeo ou anticorpo, e incluem radionuclídeos, enzimas, substratos, cofatores, inibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminescentes, partículas magnéticas e semelhante. Moléculas citotóxicas adequadas podem ser direta ou indiretamente ligadas no polipeptídeo ou anticorpo, e incluem toxinas de bactéria ou de planta (por exemplo, difteria, toxina, saporina, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina e semelhante), bem como radionuclídeos terapêuticos, tais como iodo-131, rênio-188 ou ítrio-90 (quer diretamente ligado no polipeptídeo ou anticorpo, quer indiretamente ligado através de um grupo quelante, por exemplo). Polipeptídeos ou anticorpos também podem ser conjugados em drogas citotóxicas, tal como adriamicina. Para ligação indireta de uma molécula citotóxica ou detectável, a molécula citotóxica ou detectável pode ser

conjugada com um membro de um par de complemento / anticomplemento, onde o outro membro é ligado na porção de polipeptídeo ou anticorpo. Para estes propósitos, biotina/estreptavidina é um par complemento / anticomplemento exemplar.

5 Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 também podem atuar como "antagonistas" de IL-31 para bloquear ligação de IL-31 e transdução de sinal *in vitro in vivo*. Estas moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 seriam úteis para inibir atividade de IL-31 ou ligação de proteína.

10 Proteínas de fusão polipeptídeo - toxina ou proteínas de fusão anticorpo - toxina podem ser usadas para inibição de tecido ou célula selecionada(o) (por exemplo, para tratar tecidos ou células de câncer). Alternativamente, se o polipeptídeo tem múltiplos domínios funcionais (i.e., um domínio de ativação ou um domínio de ligação de receptor, mais um
15 domínio de seleção), uma proteína de fusão incluindo apenas o domínio de seleção pode ser adequada para dirigir uma molécula detectável ou uma molécula complementar para um tipo de célula ou tecido de interesse. Em casos onde o domínio apenas proteína de fusão inclui uma molécula complementar, a molécula anti-complementar pode ser conjugada em uma
20 molécula citotóxica ou detectável. Tais proteínas de fusão de domínio - molécula complementar assim representam um veículo ou agente de transporte selecionador genérico para liberação célula/tecido-específica de conjugados de molécula citotóxica / detectável - anti-complementar genéricos.

25 Um outro objetivo da presente invenção é uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora de qualquer um dos anticorpos aqui acima e abaixo descritos, ou uma sua seqüência degenerada ou fita complementar. Em relação a isto, o termo "molécula de ácido nucleico" inclui todos os tipos diferentes de ácidos nucleicos, incluindo sem limitação ácidos

desoxirribonucleicos (e.g., DNA, cDNA, gDNA, DNA sintético, etc.), ácidos ribonucleicos (e.g., RNA, mRNA, etc.) e ácidos peptídeo-nucleicos (PNA). Em uma modalidade preferida, a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA, tal como uma molécula de DNA de fita dupla ou uma molécula de cDNA. O termo "isolado" significa moléculas de ácido nucleico que têm sido identificadas e separadas de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está ordinariamente associada na fonte natural. Uma molécula de ácido nucleico isolada é diferente na forma ou no ambiente na(o) qual ela é encontrada na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas portanto são distinguidas da molécula de ácido nucleico específica porque ela existe nas células naturais. Uma seqüência degenerada designa qualquer seqüência de nucleotídeos codificadora de mesma seqüência de aminoácidos como uma seqüência de nucleotídeos de referência, mas compreendendo uma seqüência de nucleotídeos distinta como um resultado da degeneração do código genético.

Um outro objetivo desta invenção é um vetor compreendendo DNA codificador dos anticorpos descritos acima ou abaixo. O vetor pode ser qualquer vetor de expressão ou de clonagem, integrativo ou autonomamente replicativo, funcional em qualquer célula procariótica ou eucariótica. Em particular, o vetor pode ser um plasmídeo, cosmídeo, vírus, fago, episomo, cromossomo artificial, e semelhante. O vetor pode compreender elementos regulatórios, tais como um promotor, terminador, intensificador, marcador de seleção, origem de replicação, etc. Exemplos específicos de tais vetores incluem plasmídeos procarióticos, tais como plasmídeos pBR, pUC ou pcDNA; vetores virais, incluindo vetores retroviral, adenoviral ou AAV; bacteriófagos; baculovírus; BAC ou YAC, etc., como será discutido abaixo. A seqüência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vetor por uma variedade de procedimentos. Em geral, DNA é inserido em um sítio(s) de endonuclease de restrição apropriado usando técnicas conhecidas na arte.

Construção de vetores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação padrão que são conhecidas por técnicos experientes.

Um outro da presente invenção é uma célula hospedeira recombinante, sendo que a dita célula compreende uma molécula de ácido nucleico ou um vetor como definido acima. A célula hospedeira pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. Exemplos de células procarióticas incluem bactérias, tal como *E. coli*. Exemplos de células eucarióticas são células de levedura, células de planta, células de mamífero e células de inseto incluindo qualquer cultura de célula primária ou linhagem de célula estabelecida (e.g., 3T3, Vero, HEK293, TN5, etc.). Células hospedeiras adequadas para a expressão de proteínas glicosiladas são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células invertebradas incluem células de inseto tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, bem como células de plantas. Exemplos de linhagens de célula hospedeira de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) e células COS. Exemplos mais específicos incluem linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico de humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescerem em cultura de suspensão, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovário de hamster chinês ADHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células Sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmão de humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado de humano (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51). Células de mamífero particularmente preferidas da presente invenção são células CHO.

Como mostrado aqui acima, os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos por qualquer técnica conhecida por si na arte, tal como por tecnologias recombinantes, síntese química, clonagem, ligações,

ou combinações das mesmas. Em uma modalidade particular, os anticorpos são produzidos por tecnologias recombinantes, e.g., pela expressão de um ácido nucleico correspondente em uma célula hospedeira adequada. Outro objetivo desta invenção é portanto um método de produzir um anticorpo da presente invenção, o método compreendendo cultivar uma célula hospedeira recombinante da invenção sob condições que permitem a expressão da molécula de ácido nucleico, e recuperar o polipeptídeo produzido. O polipeptídeo produzido pode ser glicosilado ou não, ou pode conter outras modificações após tradução dependendo do tipo de célula hospedeira usado.

5 Muitos livros e revisões proporcionam ensinamentos sobre como clonar e produzir proteínas recombinantes usando vetores e células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, tais como alguns títulos na série "A Practical Approach" publicado por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; 10 "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Os vetores a serem usados no método de produzir um anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser vetores episomais ou não/homologamente integrados, que podem ser introduzidos dentro das células hospedeiras apropriadas por qualquer meio adequado (transformação, transfecção, conjugação, fusão de protoplasto, electroporação, precipitação por fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.). Fatores de importância em seleção de um plasmídeo, vetor viral ou retroviral particular incluem: a facilidade com a qual as células recipientes que contêm o vetor podem ser reorganizadas e selecionadas daquelas células recipientes que não contêm o

20 vetor; o número de cópias do vetor que são desejadas em um hospedeiro particular; e se é desejável "transportar" o vetor entre as células hospedeiras de espécies diferentes. Os vetores devem permitir a expressão do polipeptídeo ou das proteínas de fusão em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, sob o controle de seqüências regulatórias de iniciação /

25

terminação de transcrição apropriadas, que são escolhidas para serem constitutivamente ativas ou induzíveis em dita célula. Uma linhagem de célula substancialmente enriquecida em tais células pode ser então isolada para proporcionar uma linhagem de célula estável.

5 As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vetores de clonagem ou de expressão aqui descritos para produção de proteína e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados como apropriado para indução de promotores, seleção de transformantes, ou amplificação de genes codificadores das seqüências desejadas. As condições de cultura, tais
10 como meios, temperatura, pH e semelhante, podem ser selecionadas pelo técnico experiente sem experimentação indevida. Em geral, princípios, protocolos, e técnicas práticas para maximizar a produtividade de culturas celulares podem ser encontrados em "Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook et al.,
15 supra.

Células preferidas a serem usadas na presente invenção são células hospedeiras eucarióticas, e.g. células de mamífero, tais como células de humano, de macaco, de camundongo, e de Ovário de Hamster Chinês (CHO), porque proporcionam modificações após tradução em moléculas de
20 proteína, incluindo dobramento correto ou glicosilação em sítios corretos. Exemplos de células hospedeiras de mamífero adequadas incluem células de rim de macaco verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), célula de rim de embrião de humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de rim de hamster bebê (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de
25 rim canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovário de hamster chinês (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986)), células de pituitária de rato (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rato (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de rim de macaco transformadas com SV40 (COS-

1; ATCC CRL 1650), melanoma de osso e carcinoma hepatocelular de humano (por exemplo Hep G2), células embriônicas murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) e numerosas outras linhagens de célula. Células hospedeiras eucarióticas alternativas são células de levedura (e.g.,
5 Saccharomyces, Kluyveromyces, etc.) transformadas com vetores de expressão. Também células de levedura podem realizar modificações de peptídeos após tradução incluindo glicosilação. Existem numerosas estratégias de DNA recombinante que utilizam seqüências de promotor forte e número de cópias alto de plasmídeos que podem ser utilizados para produção
10 das proteínas desejadas em levedura. Células de levedura reorganizam seqüências líder em produtos de gene de mamífero clonado e secretam polipeptídeos possuindo seqüências líder (i.e., pre-peptídeos).

Para produção de rendimento alto, de longa duração de um polipeptídeo recombinante, expressão estável é preferida. Por exemplo,
15 linhagens de célula que estavelmente expressam o polipeptídeo de interesse podem ser transformadas usando vetores de expressão que podem conter origem virais de replicação e/ou elementos de expressão endógenos e um gene marcador selecionável no mesmo vetor ou em um vetor separado. Após a introdução do vetor, as células podem ser permitidas crescerem por 1 -2 dias
20 em um meio enriquecido antes de serem mudadas para meio seletivo. O propósito do marcador selecionável é conferir resistência para seleção, e sua presença permite crescimento e recuperação de células que bem sucedidamente expressam as seqüências introduzidas. Clones resistentes de células estavelmente transformadas podem ser proliferados usando técnicas de
25 cultura de tecido apropriadas para o tipo de célula. Uma linhagem de célula substancialmente enriquecida em tais células pode ser então isolada para proporcionar uma linhagem de célula estável.

Um método particularmente preferido de produção de rendimento alto de um polipeptídeo recombinante da presente invenção é

através do uso de amplificação por di-hidro-folato redutase (DHFR) em células CHO deficientes em DHFR, pelo uso de níveis sucessivamente crescentes de metotrexato como descrito em US 4.889.803. O polipeptídeo obtido pode estar em uma forma glicosilada.

5 Anticorpos aqui também podem ser expressados em outras células eucarióticas, tais como células de ave, de fungo, de inseto, de levedura, ou de planta. O sistema baculovírus proporciona um meio eficiente para introduzir genes clonados em células de inseto. Os materiais para sistemas de expressão de célula de inseto / baculovírus estão comercialmente
10 disponíveis na forma de kit de, inter alia, Invitrogen.

 Em adição às tecnologias de DNA recombinante, os anticorpos desta invenção podem ser preparados por tecnologias de síntese química. Exemplos de tecnologias de síntese química são síntese em fase sólida e síntese em fase líquida. Como uma síntese em fase sólida, por exemplo, o
15 aminoácido correspondendo a terminação-carboxila do polipeptídeo a ser sintetizado é ligado em um suporte que é insolúvel em solventes orgânicos e, por repetição alternada de reações (e.g., por condensação seqüencial de aminoácidos com seus grupos amino e grupos funcionais de cadeia lateral protegidos com grupos protetores apropriados), a cadeia de polipeptídeo é
20 estendida. Métodos de síntese em fase sólida são basicamente classificados pelo método tBoc e pelo método Fmoc, dependendo do tipo de grupo protetor usado. Proteínas totalmente sintéticas são mostradas na literatura (Brown A et al., 1996).

 Os anticorpos da presente invenção podem ser produzidos,
25 formulados, administrados, ou genericamente usados em outras formas alternativas que podem ser preferidas de acordo com o método de uso e/ou de produção desejado. As proteínas da invenção podem ser modificadas após tradução, por exemplo por glicosilação. Os polipeptídeos ou as proteínas da invenção podem ser obtidas em forma isolada (ou purificada) biologicamente

ativa, ou como precursores, derivados e/ou seus sais.

Em outra modalidade, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de proteínas de fusão IL-31 podem ser usadas(os) para extermínio *in vivo* de tecidos alvo onde os receptores de IL-31 são expressados) (Veja, geralmente, Hornick et al., Blood 89:4437-47, 1997). As proteínas de fusão descritas permitem direcionar as moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 para um sítio de ação desejado, proporcionando deste modo uma concentração local elevada de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31, seleção de um tecido ou de uma célula indesejável (i.e., um tumor ou uma leucemia), e lise por células efetoras de célula alvo melhorada mediada por citocina fusionada. Citocinas adequadas para este propósito incluem interleucina 2 e fator estimulante de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), por exemplo.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 da presente invenção podem ser medidas(os) para sua capacidade para inibir, bloquear, ou neutralizar o ligante de IL-31 como determinado por vários modelos *in vivo* conhecidos na arte e aqui descritos, incluindo mas não limitados ao modelo NC/Nga, o modelo epicutâneo Ova, o modelo de hipersensibilidade crônica, e o modelo de hapteno crônico.

Tanto células-T residentes em pele quanto queratinócitos epidérmicos têm estado implicados na patologia de doenças de pele em humanos. Expressão de IL-31 mRNA e proteína é restrita à população de células-T CLA+ residentes em pele em humanos. Veja Pedido de Patente U.S. de número 11/353.427, depositado aos 14 de Fevereiro de 2006, aqui incorporado como referência. Como tal, um antagonista para IL-31, incluindo um anticorpo ou antagonista de receptor será útil no tratamento de doenças de epiderme e de pele que têm expressão de células-T CLA+. Tais doenças incluem, por exemplo, dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de

pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso. Marcadores de quimiocina tais como TARC e MDC são úteis para medir o efeito de um anticorpo monoclonal neutralizador para IL-31. Os efeitos inibitórios de tratamento com moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) podem ser medidos pela monitoração dos níveis de TARC e MDC.

Dermatite de contato

Dermatite de contato alérgica é definida como uma reação imune mediada por célula-T a um antígeno que entra em contato com a pele.

10 A população de células-T CLA⁺ é considerada em estar envolvida na iniciação de dermatite porque respostas de célula-T dependente de alérgeno estão basicamente confinadas na população CLA⁺ de células (Veja Santamaria-Babi, L.F., et al., *J Exp Med*: 181, 1935, (1995)). Dados recentes têm verificado que apenas células-T de memória (CD45RO⁺) CD4⁺ CLA⁺ e
15 não células-T CD8⁺ T proliferam e produzem ambas as citocinas de tipo-1 (IFN- γ) e de tipo-2 (IL-5) em resposta a níquel, um alérgeno de hipersensibilidade de contato comum. Ademais, células expressando CLA em combinação com CD4, CD45RO (memória) ou CD69 são aumentadas após estimulação níquel-específica e expressam receptores de quimiocina CXCR3,
20 CCR4, CCR10 mas não CCR6. Veja Moed H., et al., *Br J Dermatol*:51, 32, (2004).

Em modelos animais, tem sido demonstrado que dermatite alérgica de contato é dependente de célula-T e que as células-T alérgico-responsivas migram para o sítio de aplicação de alérgeno. Veja geralmente:

25 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 células-T CLA⁺ produzem IL-31 e estimulação de IL-31 de queratinócitos de pele podem induzir quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TARC e MDC, IL-31 pode estar

envolvida na patofisiologia de dermatite de contato. Em relação ao uso de um anticorpo anti-IL-31 neutralizador em um modelo em camundongo de hipersensibilidade de contato. Veja Exemplo 5.

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) podem ser usadas(os) para melhorar resultado clínico de Hipersensibilidade de Contato por inibição, redução, neutralização, prevenção ou bloqueio de inflamação e/ou arranhadura associada com doença.

Dermatite atópica

Dermatite atópica (AD) é uma doença de pele inflamatória cronicamente reincidente com uma incidência dramaticamente crescente no decorrer das últimas décadas. Clinicamente AD é caracterizada por pápulas e placas elevadamente pruríticas muitas vezes escoriadas que mostram um curso de reincidência crônica. A diagnose de AD é em sua maior parte baseada verificações clínicas maiores e menores. Veja Hanifin J.M., *Arch Dermatol*: 135, 1551 (1999). Histopatologia revela espongiose, hiperparaceratose e paraceratose focal em lesões agudas, enquanto que hiperplasia epidérmica marcante com hiper e paraceratose, acantose/hipergranulose e infiltração perivascular da derme com linfócitos e mastócitos abundantes são as indicações de lesões crônicas.

Células-T desempenham um papel central na iniciação de respostas imunes locais em tecidos e evidência sugere que células-T infiltrando em pele em particular, podem desempenhar um papel chave na iniciação e na manutenção de respostas imunes desreguladas na pele. Aproximadamente 90% de células-T infiltrantes em sítios inflamatórios expressam a Ag linfócito cutâneo-associado (CLA+) que liga E-selectina, uma molécula de adesão induzível sobre endotélio (revisto em Santamaria-Babi L.F., et al., *Eur J Dermatol*: 14, 13, (2004)). Um aumento significativo em células-T CLA+ circulantes dentre pacientes com AD comparados com

indivíduos de controle tem sido documentado (veja Teraki Y., et al., *Br J Dermatol*: 143, 373 (2000), enquanto que outros têm demonstrado que células-T CLA⁺ de memória de pacientes com AD preferencialmente respondem ao extrato de alérgeno comparadas com a população CLA⁻ (Veja Santamaria-Babi, L.F., et al., *J Exp Med*: 181, 1935, (1995)). Em humanos, a patogênese de distúrbios atópicos da pele tem estado associada com aumentos em células-T CLA⁺ que expressam níveis aumentados de citocinas de tipo Th-2 como IL-5 e IL-13 9, 10. Veja Akdis M., et al., *Eur J Immunol*: 30, 3533 (2000); e Hamid Q., et al. *Allergy Clin Immunol*: 98, 225 (1996).

Camundongos NC/Nga espontaneamente desenvolvem lesões semelhantes a AD que se igualam à AD de humano em muitos aspectos, incluindo sinais e curso clínicos, histopatologia quando alojados em condições livres de patógeno não-específico (não-SPF) a cerca de 6-8 semanas de idade. Em contraste, camundongos NC/Nga mantidos sob condições SPF não desenvolvem lesões de pele. Contudo, início de lesões de pele espontâneas e comportamento de arranhadura podem ser sincronizados em camundongos NC/Nga alojados em uma instalação SPF por injeção intradermal semanal de antígeno de ácaro de poeira bruta. Veja Matsuoka H., et al., *Allergy*: 58, 139 (2003). Portanto, o desenvolvimento de AD em NC/Nga é um modelo útil para a avaliação de agentes terapêuticos novos para o tratamento de AD.

Em adição ao modelo NC/Nga de AD espontânea, sensibilização epicutânea de camundongos usando OVA também pode ser utilizada como um modelo para induzir espessamento dérmico e epidérmico dependente de antígeno com um infiltrado mononuclear em pele de camundongos sensibilizados. Isto normalmente coincide com níveis séricos elevados de IgE específica e total, contudo nenhuma disfunção de barreira de pele ou prurido ocorre neste modelo. Veja Spergel J.M., et al., *J Clin Invest*, 101: 1614, (1998). Este protocolo pode ser modificado com o propósito de

induzir desregulação de barreira de pele e prurite por sensibilização de camundongos transgênicos DO 11.10 OVA TCR com OVA. Aumento do número de células-T antígeno-específicas que poderiam reconhecer o antígeno sensibilizador pode aumentar o nível de inflamação na pele para induzir comportamento de arranhadura e liquenificação / escamação visíveis da pele.

Ambos o modelo de AD espontânea NC/Nga e o modelo DO11.10 epicutâneo OVA são usados para avaliar a capacidade das moléculas ligantes de IL-31 ou dos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) para inibir, reduzir, ou neutralizar os efeitos de IL-31. Administração de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode resultar em uma redução em arranhadura que pode ser efetiva no tratamento de doenças pruríticas incluindo, mas não limitadas a, dermatite atópica, prurigo nodular, e eczema, porque cessação de arranhadura interromperá o progresso da dermatite, cujo desenvolvimento é dependente de arranhadura.

Modelos adicionais para medir os efeitos inibitórios das moléculas ligantes de IL-31 ou dos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) 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, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar o resultado clínico de dermatite e doenças pruríticas incluindo dermatite atópica, prurigo nodular, e eczema por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

Reações alérgicas cutâneas do tipo retardado induzidas por droga

Reações alérgicas cutâneas do tipo retardado induzidas por droga são muito heterogêneas e podem refletir muitos eventos

patofisiológicos distintos. Veja Brockow K., et al., *Allergy*: 57, 45 (2002). Mecanismos imunológicos envolvidos nestas reações têm sido mostrados como mediados quer por célula quer por anticorpo. Em alergia à droga imediata uma reação a anticorpo IgE-mediada pode ser demonstrada por um

5 teste intradérmico e/ou de picada de pele positiva após 20 min, enquanto que reações não-imediatas às drogas podem ocorrer mais do que uma hora após a última ingestão de droga e muitas vezes são mediadas por célula-T. Reações de tipo retardado mediadas por célula-T não-imediatas podem ocorrer em pacientes com reações à droga adversas à penicilinas por exemplo. Respostas

10 de célula-T proliferativa às penicilinas têm sido mostradas em serem restritas à subpopulação memória (CD45RO+) CLA+ de células-T de pacientes alérgicos à penicilina enquanto que o subconjunto CD45RO+ CLA- não mostra resposta proliferativa. Veja Blanca M., Leyva L., et al., *Blood Cells Mol Dis*:31, 75 (2003). Reações de hipersensibilidade do tipo retardado

15 (DTH) podem ser artificialmente produzidas em camundongos, permitindo avaliação de fatores que podem estar envolvidos na iniciação e na perpetuação da resposta DTH. 11-31 moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 neutralizadoras(es) poderiam ser efetivas(os) em reações de hipersensibilidade do tipo retardado.

20 Necrólise epidérmica tóxica (TEN) é uma reação à droga extremamente severa mas muito rara caracterizada por apoptose muito espalhada de epiderme com bolhas extensivas. Estudos têm mostrado que linfócitos infiltrando a bolha são células-T CLA+ e podem exibir citotoxicidade para queratinócitos epidérmicos. Veja Leyva L., et al., *J Allergy Clin Immunol*: 105, 157 (2000); e Nassif A., Bensussan A., et al., *J Allergy Clin ImmunohMA*, 1209 2004). Um sistema de camundongo transgênico, pelo qual OVA é expressada sob o controle do promotor de queratina-5 (K5) na epiderme e nos queratinócitos foliculares pilosos de camundongos, tem sido gerado para estabelecer um modelo animal para TEN.

25

Células-T CD8 + específicas para OVA, quando adotadamente transferidas para dentro de camundongos K5-OVA, sofrem ativação e proliferação nos linfonodos de drenagem da pele e selecionam a pele de camundongos K5-OVA, resultando em desenvolvimento de lesões de pele que lembram TEN.

5 Veja Azukizawa H., et al., *Eur J Immunol*: 33, 1879 (2003).

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar o resultado clínico de TEN por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

10 Pênfigo bolhoso

Pênfigo bolhoso é um distúrbio subepidérmico que se manifesta como bolhas subepidérmicas com um infiltrado dérmico de neutrófilos e eosinófilos. Diagnose é caracterizada pela presença de anticorpos antígeno-específicos contra proteínas de adesão específicas da epiderme e da junção dermal-epidermal. Veja Jordon R.E., et al., *JAMA*: 200, 751 (1967). Estudos analisando o papel de células-T na patogênese de pênfigo bolhoso pela análise de PBL e células-T de bolha de pele têm verificado uma predominância de células-T CLA+ expressando níveis aumentados de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13. Veja Teraki Y., et al., *J Invest Dermatol*: 117, 1097 (2001). Em pacientes com pênfigo bolhoso após terapia com corticosteróides sistêmicos, a frequência de células produtoras de interleucina-13, CLA+, mas não de CLA-, é significativamente diminuída. Diminuições em células CLA+ após tratamento com corticosteróide estão associadas com melhoria clínica. Veja Teraki, *ibid*.

25 Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar o resultado clínico de pênfigo bolhoso por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

Alopecia areata

Alopecia areata (AA) é considerada como uma doença autoimune restrita a tecido de folículos pilosos na qual atividade folicular é reprimida por causa da atividade continuada de infiltrados linfocíticos. AA resulta em trechos de completa perda capilar em qualquer lugar no corpo, embora perda real de folículos pilosos não ocorra, até mesmo em lesões sem pêlos. Embora sinais clínicos de inflamação estejam ausentes, biopsias de pele de sítios de doença ativa mostram inflamação linfocítica perifolicular de primariamente células CD4+, juntamente com um infiltrado intrafolicular de CD8+. Veja Kalish R.S. & Gilhar A. *J Investig Dermatol Symp Proc*: 8, 164 (2003).

Estudos têm mostrado que linfócitos CD4+ e CD8+ infiltrando em pele de escalpo expressam CLA e, em sangue periférico de indivíduos com AA, a percentagem de linfócitos CLA+ CD4+ ou CD8+ é significativamente mais alta do que aquela de controles normais. Ademais, pacientes com AA severa ou progressiva mostram uma CLA-positividade mais alta comparados com pacientes se recuperando da doença e uma diminuição em percentagem de células CLA+ comparadas com um curso clínico bom. Veja Yano S., et al., *Acta Derm Venereol*: 82, 82 (2002). Estes estudos portanto sugerem que linfócitos CLA+ podem desempenhar um papel importante em AA. Modelos de xenoenxerto têm demonstrado que células-T ativadas possivelmente desempenham um papel na patogênese de AA. Escalpo lesional de pacientes AA graftizados sobre camundongos nus desenvolve de novo pêlo coincidente com uma perda de linfócitos infiltrantes do enxerto e, transferência de células-T lesionais ativadas para camundongos SCID pode transferir perda de pêlo para explantes de escalpo de humano sobre camundongos SCID. Veja Kalish R.S. & Gilhar A. *J Investig Dermatol Symp Proc*: 8, 164(2003).

Uma variedade de terapias imunomodulatórias é parte do

tratamento usual para este distúrbio, entretanto nenhuma destas terapias têm sido consistente em sua eficácia. Veja 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). Contudo, seus usos em modelos animais válidos proporcionam uma ferramenta para examinar mecanismos moleculares de efeitos terapêuticos. Veja 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 DermatohXA*, 332 (2004).

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar resultado clínico de alopecia areata por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

Acne rosácea/Acne vulgar

Acne vulgar, um distúrbio do aparelho pilossebáceo, é o problema de pele mais comum da adolescência. Anormalidades em queratinização folicular são consideradas em produzir a lesão de acne. Acne rosácea é diferenciada de acne vulgar pela presença de pápulas vermelhas, pústulas, cistos e telangiectasia extensiva, mas a ausência de comedões (cabeças brancas). Excreção de sebo aumentada das glândulas sebáceas é um fator maior na patofisiologia de acne vulgar. Outras funções de glândula sebácea também estão associadas com o desenvolvimento de acne, incluindo lipídeos pró-inflamatórios sebáceos; citocinas diferentes localmente produzidas; neuropeptídeos e peptídeos periglandulares, tal como hormônio liberador de corticotrofina, que é produzido por sebocitos; e substância P, que é expressada nas terminações nervosas na vizinhança de glândulas aparentemente saudáveis de pacientes com acne. Veja Zouboulis C.C. *Clin Dermatol*: 22, 360 (2004).

Embora a patofisiologia de acne vulgar e de acne rosácea

permaneça desconhecida, observações clínicas e estudos histopatológicos sugerem que inflamação do folículo pilossebáceo pode ser central para a patogênese de acne rosácea e vulgar. Estudos iniciais sobre análise de subconjuntos de célula-T infiltrando lesões rosáceas indicou que a maioria das células-T expressava CD4. Veja Rufli T. & Buchner S.A. *Dermatologica*: 169, 1 (1984).

Células-T CD4⁺ produzem IL-31 e análise IHC de pele para expressão de IL-31 sugere que IL-31 é expressada em glândulas sebácea e sudorípara. Estimulação por IL-31 de queratinócitos epidérmicos induz expressão de quimiocinas que provavelmente resulta em infiltração celular sugerindo que IL-31 pode contribuir para a resposta pró-inflamatória em pele. Veja Dillon S.R., et al., *Nat Immunol*: 5, 752 (2004). IL-31 portanto pode contribuir para a patofisiologia de acne rosácea e acne vulgar.

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar resultado clínico de acne vulgar por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

Prurigo nodular

Prurigo nodular é uma erupção de nódulos liquenificados ou escoriados causada por prurido intratável que é difícil de tratar. Embora fricção crônica resulte em liquenificação, e arranhadura em escoriações lineares, indivíduos que perfuram e arrancam sua pele irritada, sarnenta, tendem a produzir pápulas marcadamente espessadas conhecidas como nódulos de prurigo. Embora prurigo nodular não seja específico para dermatite atópica, muitos pacientes com estes nódulos também têm uma reação atópica, que se manifesta como rinite alérgica, asma, ou alergia alimentar. Células-T representa, a maior parte das células infiltrantes em lesões de prurigo e estas lesões muitas vezes representam a lesão de pele prurítica maior em pacientes atópicos.

Tratamento tópico de prurigo nodular com capsaicina, um alcalóide anti-prurítico que interfere com a percepção de pruridos e dor pela depleção de neuropeptídeos como substância P em nervos cutâneos sensoriais pequenos, tem se mostrado em ser um regime efetivo e seguro resultando em

5 limpeza das lesões de pele. Veja Stander S., et al., *J Am Acad Dermatol*: 44, 471 (2001). Estudos de resposta de coceira em camundongos NC/Nga usando tratamento com capsaicina mostraram que o desenvolvimento espontâneo de lesões de dermatite foi quase completamente prevenido. Ademais, a elevação de níveis séricos de IgE foi significativamente suprimida e números de

10 mastócitos e eosinófilos infiltrantes em pele lesional dos camundongos tratados com capsaicina foram reduzidos. Veja Mihara K., et al., *Br J Dermatol*: 151, 335 (2004). As observações deste grupo sugerem que comportamento de arranhadura pode contribuir para o desenvolvimento de dermatite pela intensificação de várias respostas imunológicas, deduzindo

15 portanto que prevenção da sensação de coceira e/ou do comportamento de arranhadura associado à coceira pode ser um tratamento efetivo para AD. Veja Mihara K., et al., *Br J Dermatol*: 151, 335 (2004). Assim, os anticorpos anti-IL-31 aqui descritos serão úteis na minimização dos efeitos de AD, prurigo nodular, e outras doenças pruríticas porque é mostrado aqui que

20 reduzem a quantidade de arranhadura em camundongos NC/Nga.

Liberação crônica de IL-31 induz prurite e alopecia em camundongos segundas pelo desenvolvimento de lesões de pele se parecendo dermatite sugerindo que IL-31 pode induzir coceira. Veja Dillon S.R., et al., *Nat Immunol*: 5, 752 (2004). O envolvimento de IL-31 em indução de

25 resposta à coceira por dois métodos (i) tratamento com capsaicina de camundongos tratados contra IL-31 e (ii) tratamento contra IL-31 de camundongos nocauteados *Tac1*, que têm respostas de dor nociceptiva significativamente reduzidas por causa da falta de expressão de neuropeptídeos é testado em Exemplo 10. Em adição, se neutralização de IL-

31 em camundongos tratados contra IL-31 com moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 poderia prevenir prurite e alopecia é testada em Exemplo 12.

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar resultado clínico de prurigo nodular por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença.

Prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele

Células-T CD8⁺ específicas para Vírus do Herpes Simples (HSV) no sangue periférico e células-T CD8⁺ específicas para HSV recuperadas de lesões de herpes expressam níveis de CLA onde como células-T CD8⁺ específicas para vírus do herpes não-pele-trópicos são faltantes de expressão de CLA. Veja Koelle D.M., et al., *J Clin Invest*: 110, 537 (2002). Linfócitos T CD4⁺ reativos a HSV-2 também expressam CLA, mas em níveis mais baixos do que aqueles previamente observados para linfócitos T CD8⁺. Veja Gonzalez J.C., et al., *J Infect Dis*: 191, 243 (2005). Prurite também tem estado associada com infecções virais do herpes (Veja Hung K.Y., et al., *Blood Purif*: 16, 147 (1998), embora outras doenças virais, como HIV, também têm estado associadas com lesões de pele pruríticas. Prurite intratável, severa, muitas vezes associada com lesões de pele eritematopapulares e hipereosinofilia, é uma condição observada em alguns pacientes 36 infectados com HIV, não-atópicos. Veja Singh F. & Rudikoff D, *Am J Clin Dermatol*; 4, 111 (2003); e Milazzo F., Piconi S., et al., *Allergy*: 54, 266 (1999).

A associação de vírus trópicos de pele com prurite e células-T CLA⁺ sugere que células-T produzindo IL-31 podem estar envolvidas na patofisiologia de infecções virais.

Assim, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-

31 ou pelos antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) pode ser usada para melhorar resultado clínico de prurite associada com vírus trópicos de pele por inibição, redução, prevenção ou bloqueio da inflamação e/ou arranhadura associada com a doença. Envolvimento de IL-31 na indução de resposta à coceira, e sua redução, bloqueio, inibição ou neutralização por moléculas ligantes de IL-31 aqui descritas, pode ser medida em numerosas maneiras.

Método I (Tratamento com capsaicina de camundongos tratados contra IL-31):

Animais BALB/c de dez semanas de idade (CRL) são anestesiados e injetados com agente analgésico, cloridrato de bupranorfina, subcutaneamente a 0,1 mg/kg antes da injeção de 0,25 mL de solução a 4 mg/mL de capsaicina em etanol 10% + Tween-80 10% em solução salina subcutaneamente para dentro da nuca do pescoço. Animais são mantidos anestesiados por pelo menos 30 min após o tratamento com neurotoxina. Quarenta e oito horas mais tarde, bombas osmóticas de 14 dias são implantadas subcutaneamente para liberação contínua de 20 ug/dia de IL-31 por 14 dias. Camundongos são monitorados diariamente para alopecia e prurite usando os seguintes critérios: 0 = sem arranhadura, animal parece normal, 1 = adelgaçamento de pele em áreas pequenas, arranhadura notada, 2 = perda de pêlo menor (porções pequenas), arranhadura, 3 = perda de pêlo moderada, arranhadura, e 4 = perda de pêlo severa, excessiva arranhadura. Quando este experimento foi realizado os resultados demonstraram que embora camundongos não tratados com capsaicina mostrassem um escore de perda de pêlo / arranhadura médio de 2,625 após três dias de liberação de IL-31, camundongos tratados com capsaicina mostraram um escore significativamente mais baixo de 1. Assim camundongos tratados com capsaicina antes da liberação de IL-31 mostram ambos atraso em incidência de arranhadura e perda de pêlo e um escore mais baixo na intensidade de arranhadura e perda de pêlo durante os seis dias do experimento. Estes dados

sugerem que IL-31 induz algum componente neuronal que contribui para a alopecia e a prurite induzidas por IL-31. Portanto, neutralização de IL-31 pelas moléculas ligantes de IL-31 ou pelos antagonistas de IL-31 pode diminuir a incidência e a intensidade de coceira, e portanto de dermatite, em

5 pacientes sofrendo de distúrbios de pele que envolvem coceira.

Método II:

Camundongos que são homozigóticos nulos para o gene *Tac1* não expressam substância P ou neuroquinina detectável. Estes camundongos têm respostas de dor nociceptiva significativamente reduzidas aos estímulos

10 moderados a intensos e são portanto uma ferramenta útil para estudar a contribuição de peptídeos de taquiquinina para processamento de dor/coceira e estados doentes inflamatórios. Camundongos nocauteados *Tac1*, de doze semanas de idade, foram implantados com bombas osmóticas de 14 dias liberando 1 ug/dia de proteína IL-31 e foram observados para alopecia e

15 prurite usando os seguintes critérios: 0 = sem arranhadura, animal parece normal, 1 = adelgaçamento de pele em áreas pequenas, arranhadura notada, 2 = perda de pêlo menor (porções pequenas), arranhadura, 3 = perda de pêlo moderada, arranhadura, e 4 = perda de pêlo severa, excessiva arranhadura.

Resultados deste estudo mostram que camundongos

20 deficientes *Tac1* foram menos suscetíveis à perda de pêlo/arranhadura induzidas por IL-31 comparados com camundongos de controle de tipo selvagem. Embora 100% (10/10) dos camundongos de tipo selvagem tiveram evidência desenvolvida de arranhadura e perda de pêlo no dia 6 do tratamento com IL-31, apenas 33,3 % (2/6) dos camundongos deficientes *Tac1* estavam

25 mostrando sinais de arranhadura e perda de pêlo no mesmo instante de tempo. Estes dados mostram que IL-31 induz um componente neuronal que contribui para o fenótipo de arranhadura / perda de pêlo em camundongos tratados com IL-31 e neutralização de IL-31 por moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode diminuir a incidência de arranhadura no contexto

de dermatite.

Método III (Administração de anticorpo neutralizador de IL-31):

Camundongos fêmeas normais BALB/c (CRL) aproximadamente de 8 a 12 semanas de idade foram implantados subcutaneamente com bombas osmóticas de 14 dias (Alzet, #2002) liberando 1 μ g/dia de mIL-31. Grupos de camundongos receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de anticorpo monoclonal de rato anti-IL-31 de camundongo a 10 mg/kg (200 μ g/camundongo) duas vezes por semana partindo da semana 1 antes da liberação de IL-31. Grupos de controle de camundongos receberam injeções i.p. de veículo (PBS/0,1%BSA) com horários de dosagem idênticos. Camundongos foram classificados diariamente alopecia e prurite usando os seguintes critérios: 0 = sem arranhadura, animal parece normal, 1 = adelgaçamento de pele em áreas pequenas, arranhadura notada, 2 = perda de pêlo menor (porções pequenas), arranhadura, 3 = perda de pêlo moderada, arranhadura, e 4 = perda de pêlo severa, excessiva arranhadura.

Em todos os experimentos, camundongos tratados com mAb de rato anti-mIL-31 tiveram um atraso no início de sintomas de alopecia e prurite. Todos os grupos de camundongos tratados com mAb (independente da concentração e da frequência da dose) desenvolveram alopecia e prurite similar aos camundongos de controle no dia 13 do estudo. Estes dados sugerem que neutralização de IL-31 por moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode atrasar o início da resposta à arranhadura / perda de pêlo induzida por IL-31. Os efeitos de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são medidos por inibição de arranhadura, coceira, dermatite, uma redução em expressão de IL-3 IRA em queratinócitos, e/ou uma redução em escore para alopecia e prurite.

Inflamação é uma resposta protetora por um organismo para afastar um agente invasor. Inflamação é um evento em cascata que envolve muitos mediadores humorais e celulares. Por um lado, supressão de respostas inflamatórias pode levar a um hospedeiro imunocomprometido; entretanto, se deixada incontrolada, inflamação pode levar a complicações sérias incluindo doenças inflamatórias crônicas (e.g., artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e semelhante), choque séptico e falência múltipla de órgãos. O importante é que estes estados doentes compartilham mediadores inflamatórios comuns. As doenças coletivas que são caracterizadas pela inflamação têm um impacto grande sobre mortalidade e morbidez humanas. Portanto, está claro que polipeptídeos ligantes e anticorpos antiinflamatórios tais como polipeptídeos ligantes e anticorpos anti-IL-31 aqui descritos, poderiam ter potencial terapêutico crucial para um número vasto de doenças humanas e animais, desde asma e alergia até autoimunidade e choque séptico. Como tal, uso de polipeptídeos ligantes e anticorpos anti-IL-31 antiinflamatórios aqui descritos pode ser utilizado terapeuticamente como antagonistas de IL-31 aqui descritos, particularmente em doenças tais como artrite, endotoxemia, doença inflamatória intestinal, psoríase, doença relacionada e semelhante.

1. Artrite

Artrite, incluindo osteoartrite, artrite reumatóide, articulações artríticas como um resultado de lesão, e semelhante, são condições inflamatórias comuns que se beneficiariam do uso terapêutico de polipeptídeos ligantes e anticorpos anti-IL-31 antiinflamatórios, tais como polipeptídeos ligantes e anticorpos anti-IL-31 da presente invenção. Por exemplo, artrite reumatóide (RA) é uma doença sistêmica que afeta o corpo inteiro e é uma das formas mais comuns de artrite. É caracterizada pela inflamação da membrana revestindo a articulação, que causa dor, rigidez, aquecimento, vermelhidão e inchamento. Células inflamatórias liberam

enzimas que digerem osso e cartilagem. Como um resultado de artrite reumatóide, a membrana de revestimento de articulação inflamada, a sinóvia, pode invadir e danificar osso e cartilagem levando à deterioração da articulação e dor severa dentre outros efeitos fisiológicos. A articulação envolvida pode perder sua forma e seu alinhamento resultando em dor e perda de movimento.

Artrite reumatóide (RA) é uma doença imune-mediada particularmente caracterizada por inflamação e subsequente dano de tecido levando à incapacidade severa e mortalidade aumentada. Uma variedade de citocinas são localmente produzidas nas articulações reumatóides. Estudos numerosos têm demonstrado que IL-1 e TNF-alfa, duas citocinas pró-inflamatórias prototípicas, desempenham um papel importante nos mecanismos envolvidos em inflamação sinovial e em destruição progressiva de articulação. De fato, a administração de inibidores de TNF-alfa e de IL-1 em pacientes com RA tem levado a uma melhoria dramática dos sinais clínicos e biológicos de inflamação e uma redução de sinais radiológicos de erosão óssea e destruição de cartilagem. Entretanto, apesar destes resultados encorajadores, uma percentagem significativa de pacientes não responde a estes agentes, sugerindo que outros mediadores também estão envolvidos na patofisiologia de artrite (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149. 2002). Um daqueles mediadores poderia ser IL-31, e como tal uma molécula que se liga em ou inibe IL-31, tal como polipeptídeos ligantes ou anticorpos anti IL-31, poderia servir como um agente terapêutico valioso para reduzir inflamação em artrite reumatóide, e outras doenças artríticas.

Há vários modelos animais para artrite reumatóide conhecidos na arte. Por exemplo, no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), camundongos desenvolvem artrite inflamatória crônica que se parece muito com artrite reumatóide de humano. Visto que CIA compartilha características patológicas e imunológicas similares à RA, isto a torna um modelo ideal para

selecionar compostos inflamatórios de humano potenciais. O modelo de CIA é um modelo bem conhecido em camundongos que depende de ambas uma resposta imune, e uma resposta inflamatória, com o propósito de ocorrer. A resposta imune compreende a interação de células-B e células-T CD4⁺ em resposta ao colágeno, que é dada como um antígeno, e acarreta a produção de anticorpos anti-colágeno. A fase inflamatória é o resultado de respostas de tecido dos mediadores de inflamação, como uma consequência de alguns destes anticorpos reagirem cruzadamente com o colágeno nativo do camundongo e ativarem a cascata de complemento. Uma vantagem no uso de modelo de CIA é que os mecanismos básicos de patogênese são conhecidos. Os epitopos relevantes de célula-T e de célula-B sobre colágeno de tipo II têm sido identificados, e vários parâmetros imunológicos (e.g., hipersensibilidade de tipo retardado e anticorpos anti-colágeno) e inflamatórios (e.g., citocinas, quimiocinas, e enzimas degradadoras de matriz) relacionados com a artrite imune-mediada têm sido determinados, e podem assim 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 polipeptídeos solúveis compreendendo IL-31RA (incluindo receptores heterodiméricos e multiméricos aqui descritos), tais como IL-31RA-Fc4 ou outras proteínas de fusão e solúveis de IL-31RA para estes camundongos modelo de CIA pode ser usada para avaliar o uso de IL-31RA para melhorar sintomas e alterar o curso da doença. Como uma molécula que modula resposta inflamatória e imune, IL-31, pode induzir a produção de SAA, que está implicado na patogênese de artrite reumatóide, moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 podem reduzir a atividade de SAA *in vitro* e *in vivo*, a administração sistêmica ou local de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode potencialmente

suprimir a resposta inflamatória em RA.

2. Endotoxemia

Endotoxemia é uma condição severa comumente resultante de agentes infecciosos tais como bactérias e outros agentes de doença infecciosa, sepsia, síndrome de choque tóxico, ou em pacientes imunocomprometidos sujeitos a infecções oportunistas, e semelhante. Polipeptídeos ligantes e anticorpos antiinflamatórios terapeuticamente úteis, tais como polipeptídeos ligantes e anticorpos anti-IL-31 da presente invenção, poderiam auxiliar na prevenção e no tratamento de endotoxemia em animais e humanos. Outros agentes terapêuticos potenciais incluem polipeptídeos IL-3 IRA, polipeptídeos receptores heterodiméricos e multiméricos, ou parceiros de ligação ou anticorpos anti IL-31 da presente invenção, e semelhante, poderiam servir como um agente terapêutico valioso para reduzir inflamação e efeitos patológicos em endotoxemia.

Endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) utiliza muitos dos mediadores pró-inflamatórios que produzem efeitos patológicos nas doenças infecciosas e endotoxemia induzida por LPS é um modelo amplamente usado e aceitável para estudar os efeitos farmacológicos de agentes imunomoduladores e pró-inflamatórios potenciais. LPS, produzido em bactérias gram-negativas, é um agente causador maior na patogênese de choque séptico (Glausner et al., Lancet 338:732. 1991). Um estado semelhante a choque pode de fato ser induzido experimentalmente por uma única injeção de LPS em animais. Moléculas produzidas por células respondendo ao LPS podem selecionar patógenos direta ou indiretamente. Embora estas respostas biológicas protejam o hospedeiro contra patógenos invasores, também podem causar dano. Assim, estimulação massiva de imunidade inata, ocorrendo como um resultado de infecção por bactérias Gram-negativas, leva à produção excessiva de citocinas e de outras moléculas, e ao desenvolvimento de uma síndrome fatal, síndrome de choque

séptico, que é caracterizada por febre, hipotensão, coagulação intravascular disseminada, e falência múltipla de órgãos (Dumitru et al. Cell 103:1071-1083,2000).

Estes efeitos tóxicos de LPS estão relacionados em sua maioria à ativação de macrófago levando à liberação de múltiplos mediadores inflamatórios. Dentre estes mediadores, TNF parece desempenhar um papel crucial, como indicado pela prevenção de toxicidade de LPS pela administração de anticorpos neutralizadores anti-TNF (Beutler et al., Science 229:869, 1985). Está bem estabelecido que a injeção de 1 ug de LPS de *E. coli* em um camundongo C57B1/6 resultará em aumentos significativos em IL-6, TNF-alfa, IL-1, e proteínas de fase aguda circulantes (por exemplo, SAA) aproximadamente 2 horas após injeção. A toxicidade de LPS parece ser mediada por estas citocinas porque imunização passiva contra estes mediadores pode resultar em mortalidade diminuída (Beutler et al., Science 229:869, 1985). As estratégias de imunointervenção potencial para a prevenção e/ou tratamento de choque séptico incluem mAb anti-TNF, antagonista de receptor de IL-1, LIF, IL-10, e G-CSF. Visto que LPS induz a produção de fatores pró-inflamatórios possivelmente contribuindo com a patologia de endotoxemia, a neutralização de atividade de IL-31, SAA ou de outros fatores pró-inflamatórios pela antagonização de polipeptídeo IL-31 pode ser usada para reduzir os sintomas de endotoxemia, tais como vistos em choque endotóxico. Outros agentes terapêuticos potenciais incluem moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31.

3. Doença inflamatória intestinal. IBP

Nos Estados Unidos aproximadamente muitas pessoas sofrem de Doença Inflamatória Intestinal (IBD) que pode afetar quer cólon quer reto (colite ulcerativa) ou ambos, intestinos delgado e grosso (doença de Crohn). A patogênese destas doenças não está clara, mas envolvem inflamação crônica dos tecidos acima citados. Agentes terapêuticos potenciais incluem

polipeptídeos IL-3 IRA, polipeptídeos receptores heterodiméricos e multiméricos solúveis, ou parceiros de ligação ou anticorpos anti-IL-31 da presente invenção, e semelhante, poderiam servir como um agente terapêutico valioso para reduzir inflamação e efeitos patológicos em IBD e doenças relacionadas.

Colite ulcerativa (UC) é uma doença inflamatória do intestino grosso, comumente chamado de cólon, caracterizada por inflamação e ulceração da mucosa ou do revestimento mais interno do cólon. Esta inflamação causa esvaziamento freqüente do cólon, resultando em diarreia. Sintomas incluem soltura das fezes e câimbra abdominal associada, febre e perda de peso. Embora a causa exata de UC seja desconhecida, pesquisa recente sugere que as defesas naturais do corpo estão operando contra proteínas no corpo que o corpo pensar serem estranhas (uma "reação autoimune"). Talvez devido ao fato de se parecerem com proteínas bacterianas no intestino, estas proteínas podem quer instigar quer estimular o processo inflamatório que começa a destruir o revestimento do cólon. À medida que o revestimento do cólon é destruído, úlceras formam liberando muco, pus e sangue. A doença normalmente inicia na área retal e pode eventualmente se estender através do intestino grosso. Episódios repetidos de inflamação levam ao espessamento da parede do intestino e do reto com tecido cicatrizado. Morte do tecido do cólon ou sepsia pode ocorrer com doença severa. Os sintomas de colite ulcerativa variam em severidade e seu início pode ser gradual ou súbito. Ataques podem ser provocados por muitos fatores, incluindo estresse ou infecções respiratórias.

Embora correntemente não haja cura disponível para UC, tratamentos são focalizados sobre supressão de processo inflamatório anormal no revestimento do cólon. Tratamentos incluindo corticosteróides imunossuppressores (eg. azatioprina, mercaptopurina, e metotrexato) e amino-salicilatos estão disponíveis para tratar a doença. Contudo, o uso por longa

duração de imunossupressores tais como corticosteróides e azatioprina pode resultar em efeitos colaterais sérios incluindo adelgaçamento dos ossos, cataratas, infecção, e efeitos em fígado e medula óssea. Nos pacientes nos quais terapias correntes não são bem sucedidas, cirurgia é uma opção. A

5 cirurgia envolve a remoção do cólon inteiro e do reto.

Há vários modelos animais que podem parcialmente imitar colite ulcerativa crônica. O modelo mais amplamente usado é o modelo de colite induzida por ácido 2,4,6-trinitro-benzeno-sulfônico / etanol (TNBS), que induz inflamação e ulceração crônicas no cólon. Quando TNBS é

10 introduzido no cólon de camundongos suscetíveis via instilação intra-retal, induz resposta imune mediada por célula-T na mucosa colônica, neste caso acarretando uma inflamação mucosal massiva caracterizada por infiltração densa de células-T e macrófagos através da parede inteira do intestino grosso. Além disso, este quadro histopatológico é acompanhado pelo quadro clínico

15 de perda de peso progressiva (emaciação), diarreia sanguinolenta, prolapso retal, e espessamento de parede de intestino grosso (Neurath et al. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000).

Outro modelo de colite usa dextrano-sulfato de sódio (DSS), que induz colite aguda manifestada por diarreia sanguinolenta, perda de peso,

20 encurtamento do cólon e ulceração mucosal com infiltração de neutrófilos. Colite induzida por DSS é caracterizada histologicamente por infiltração de células inflamatórias para dentro da lamina propria, com hiperplasia linfóide, dano de cripta focal, e ulceração epitelial. Estas mudanças são consideradas em se desenvolverem devido a um efeito tóxico de DSS sobre o epitélio e por

25 fagocitose de células de lamina própria e produção de TNF-alfa e IFN-gama. Apesar de seu uso comum, várias questões relacionadas com os mecanismos de DSS sobre a relevância para a doença de humano permanecem não resolvidas. DSS é considerada como um modelo dependente de célula-T porque é observada em animais deficientes em célula-T tais como

camundongos SCID.

A administração de parceiros de ligação ou anticorpos anti-IL-31, polipeptídeos compreendendo IL-31RA solúveis (incluindo receptores heterodiméricos e multiméricos), tal como IL-31RA-Fc4 ou outras proteínas de fusão e solúveis IL-31RA para estes modelos de TNBS ou DSS pode ser usada para avaliar o uso de antagonistas de IL-31 para melhorar sintomas e alterar o curso de doença gastrointestinal. IL-31 pode desempenhar um papel na resposta inflamatória em colite, e a neutralização de atividade de IL-31 pela administração de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 é uma abordagem terapêutica potencial para IBD.

4. Psoríase

Psoríase é uma condição de pele crônica que afeta mais do que sete milhões de americanos. Psoríase ocorre quando células novas de pele crescem anormalmente, resultando em porções de pele inflamadas, inchadas, e escamosas onde a pele velha não tem se soltado suficientemente rápida. Psoríase de placa, a forma mais comum, é caracterizada por porções de pele inflamadas ("lesões") cobertas com escamas brancas prateadas. Psoríase pode estar limitada a algumas placas ou envolver áreas moderadas a extensivas de pele, parecendo mais comumente sobre o escalpo, joelhos, cotovelos e tronco. Embora seja elevadamente visível, psoríase não é uma doença contagiosa. A patogênese da doença envolve inflamação crônica dos tecidos afetados. Polipeptídeos IL-31RA, polipeptídeos receptores heterodiméricos e multiméricos, ou parceiros de ligação ou anticorpos anti-IL-31 da presente invenção, e semelhante, poderia servir como um agente terapêutico valioso para reduzir inflamação e efeitos patológicos em psoríase, outras doenças inflamatórias de pele, alergias de pele e mucosal, e doenças relacionadas.

Psoríase é um distúrbio inflamatório da pele mediado por célula-T que pode causar desconforto considerável. É uma doença para a qual não há cura e afeta pessoas de todas as idades. Psoríase afeta

aproximadamente dois por cento das populações da Europa e da América do Norte. Embora indivíduos com psoríase suave possam muitas vezes controlar sua doença com agentes tópicos, mais do que um milhão de pacientes em todo o mundo exigem terapia imunossupressiva sistêmica ou com ultravioleta.

5 Infelizmente, a inconveniência e os riscos da radiação ultravioleta e as toxicidades de muitas terapias limitam seu uso de longa duração. Além disso, pacientes normalmente têm recorrência de psoríase, e em alguns casos r [sic]

IL-31 foi isolada de tecido conhecido em ter função imunológica importante e que contém células que desempenham um papel no sistema imune. IL-31 é expressada em células de sangue periférico, ativadas, 10 selecionadas CD3+, e tem sido mostrado que expressão de IL-31 aumenta após ativação de célula-T.. Além disso, resultados de experimentos descritos aqui na seção de Exemplos sugerem que polipeptídeos da presente invenção podem ter um efeito sobre o crescimento / a expansão de monócitos / 15 macrófagos, células-T, células-B, células NK e/ou o estado diferenciado de monócitos / macrófagos, células-T, células-B, células NK ou destes progenitores de células. Fatores que tanto estimulam proliferação de progenitores hematopoiéticos quanto ativam células maduras são geralmente conhecidos, contudo, proliferação e ativação também podem exigir fatores de 20 crescimento adicionais. Por exemplo, tem sido mostrado que IL-7 e Steel Factor (ligante c-kit) foram exigidos para formação de colônias de progenitores NK. IL-15 + IL-2 em combinação com IL-7 e Steel Factor foi mais efetivo (Mrozek et al., Blood 87:2632-2640, 1996). Contudo, citocinas não identificadas podem ser necessárias para proliferação de subconjuntos 25 específicos de células NK e/ou progenitores NK (Robertson et. al., Blood 76:2451-2438, 1990). Similarmente, IL-31 pode atuar sozinha ou de acordo com ou sinergicamente com outras citocinas para intensificar crescimento, expansão de proliferação e modificação de diferenciação de monócitos / macrófagos, células-T, células-B ou células NK

A presente invenção proporciona um método para inibir a ativação ou diferenciação de monócitos / macrófagos. Monócitos são células incompletamente diferenciadas que migram para vários tecidos onde maturam e se tornam macrófagos. Macrófagos desempenham um papel central em resposta imune pela apresentação de antígeno aos linfócitos e desempenham um papel sustentador como células acessórias para linfócitos pela seleção de numerosas citocinas. Macrófagos podem incorporar moléculas extracelulares e sob ativação têm uma capacidade aumentada para exterminar microorganismos intracelulares e células de tumor. Macrófagos ativados também estão envolvidos em estimulação de inflamação aguda ou local.

A distribuição em tecido de receptores para uma dada citocina oferece uma indicação forte dos sítios potenciais de ação que daquela citocina. Expressão de IL-31RA foi vista em monócitos e células-B, com um aumento dramático de expressão sob ativação para células-T CD3+, CD4+, e CD8+. Em adição, duas linhagens de célula monocítica, 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 positivas para expressão de IL-31RA.

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

Assim, modalidades particulares da presente invenção são direcionadas para o uso de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como antagonistas em doenças inflamatórias e imunes ou condições tal como pancreatite, diabetes de tipo I (IDDM), câncer pancreático, pancreatite, Doença de Graves, doença inflamatória intestinal (IBD), Doença de Crohn, câncer intestinal e de cólon, diverticulose, doença autoimune, sepsia, transplante de órgãos ou de medula óssea; inflamação devido a trauma,

cirurgia ou infecção; amiloidose; esplenomegalia; doença de enxerto versus hospedeiro; e onde inibição de inflamação, supressão imune, redução de proliferação de células hematopoiéticas, imunes, inflamatórias ou linfóides, macrófagos, células-T (incluindo células Th1 e Th2, células CD4+ e CD8+),
5 supressão de resposta imune a um patógeno ou antígeno. Além disso a presença de expressão de IL-31 RA em células imunes ativadas tais como células CD4+ e CD 19+ ativadas mostrou que o receptor IL-31RA pode estar envolvido nas reações defensivas imunes do corpo contra invasores estranhos: tais como microorganismos e fragmentos celulares, e poderia desempenhar
10 um papel em respostas imunes durante inflamação e formação de câncer. Como tais, anticorpos e parceiros de ligação da presente invenção que são agonísticos ou antagonísticos para função de receptor IL-31RA, tal como IL-31, podem ser usados para modificar resposta imune e inflamação.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 também
15 podem ser usadas(os) dentro de sistemas diagnósticos para a detecção de níveis circulantes de IL-31. Dentro de uma modalidade relacionada, anticorpos ou outros agentes que especificamente se ligam em polipeptídeos IL-31 podem ser usados para detectar polipeptídeos IL-31 circulantes. Níveis elevados ou deprimidos de polipeptídeos ligantes podem ser indicativos de
20 condições patológicas, incluindo câncer. Polipeptídeos IL-31 podem contribuir para processos patológicos e podem ser um marcador indireto de uma doença subjacente.

Em lesões ateroscleróticas, uma das primeiras anormalidades é localização de monócitos / macrófagos em células endoteliais. Estas lesões
25 poderiam ser prevenidas pelo uso de antagonistas para IL-31. Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 também podem ser usadas(os) como antagonistas para a IL-31. Além disso, leucemia monoblástica está associada com uma variedade de anormalidades clínicas que refletem a liberação dos produtos biológicos do macrófago, exemplos incluem níveis

altos de lisozima no soro e na urina e febres altas. Além disso, tais leucemias exibem um aumento anormal de células monocíticas. Estes efeitos poderiam possivelmente ser prevenidos pelos antagonistas para IL-31, tal como aqui descrito. Além disso, anti- IL-31 pode ser conjugado em moléculas tais como grupos tóxicos e citocinas, como aqui descrito para dirigir o extermínio de células monocíticas de leucemia.

Visto que IL-31 é expressada em uma célula-T, numa maneira específica para monócito e macrófago, e estas doenças envolvem anormalidades em células monocíticas, tais como proliferação, função, localização, e ativação de células, 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 retirar uma amostra biológica de um paciente, tal como sangue, saliva, ou biopsia, e compará-la com uma amostra de controle normal. Métodos histológicos, citológicos, citométricos de fluxo, bioquímicos e outros métodos podem ser usados para determinar os níveis relativos ou a localização de IL-31, ou células expressando IL-31, i.e., monócitos, na amostra do paciente comparado com o controle normal. Uma mudança no nível (aumento ou decréscimo) de expressão de IL-31, ou uma mudança no número ou na localização de monócitos (e.g., aumento ou infiltração de células monocíticas em tecidos onde não estão normalmente presentes) comparado com um controle seria indicativa de doença. Tais métodos diagnósticos também podem incluir o uso de etiquetas radiométricas, fluorescentes, e colorimétricas ligadas nos polinucleotídeos, polipeptídeos ou anticorpos da presente invenção. Tais métodos são bem conhecidos na arte e aqui descritos.

Tem sido mostrado que IL-31 é expressada em células mononucleares ativadas, e pode estar envolvida em regulação de inflamação. Como tais, polipeptídeos da presente invenção podem ser ensaiados e usados

para sua capacidade para modificar inflamação, ou pode ser usada como um marcador para inflamação. Métodos para determinar qualidades pró-inflamatórias e antiinflamatórias de IL-31 são conhecidos na arte e aqui discutidos. Além disso, pode estar envolvida em supra-regulação da produção de reagentes de fase aguda, tal como proteína amilóide A sérica (SAA), α 1-antiquimiotripsina, e haptoglobina, e que expressão de ligante de receptor IL-3 IRA pode ser aumentada sob injeção de lipopolissacarídeo (LPS) *in vivo* que estão envolvidas em resposta inflamatória (Dumoutier, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). Produção de proteínas de fase aguda, tal como SAA, é considerada s mecanismo de sobrevivência de duração curta onde inflamação é benéfica; contudo, manutenção de proteínas de fase aguda por períodos mais longos contribui para inflamação crônica e pode ser perigosa para saúde humana. Para revisão, veja Uhlar, CM and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523, 1999, e Baumann H. and Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Além disso, a proteína de fase aguda SAA está implicada na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas, está implicada em aterosclerose e artrite reumatóide, e é o precursor para proteína amilóide A depositada em amiloidose (Uhlar, CM e Whitehead, supra.). Assim, onde um ligante tal como a IL-31 que atua como uma molécula pró-inflamatória e induz produção de SAA, antagonistas seriam úteis em tratamento de doença inflamatória e outras doenças associadas com proteínas de resposta de fase aguda induzida pelo ligante. Tais antagonistas são proporcionados pela presente invenção. Por exemplo, um método de reduzir inflamação compreende administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de IL-31, ou anticorpo anti-IL-31 (e.g., anticorpo neutralizador) que é suficiente para reduzir inflamação. Além disso, um método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação pode compreender: (1) determinar um nível de proteína amilóide A sérica; (2) administrar uma composição compreendendo um polipeptídeo

IL-31 ou um anticorpo anti-IL-31 como aqui descrito em um veículo farmacologicamente aceitável; (3) determinar um nível de pós-administração de proteína amiloide A sérica; (4) comparar o nível de proteína amiloide A sérica em etapa (1) com o nível de proteína amiloide A sérica em etapa (3),
5 sendo que uma falta de aumento ou um decréscimo em nível de proteína amiloide A sérica é indicativo de supressão de uma resposta inflamatória.

Distribuição em tecido do mRNA correspondendo ao seu cDNA de receptor IL-3 IRA mostrou que nível de mRNA foi mais alto em monócitos e células de próstata, e é elevada em monócitos ativados, e células
10 CD4+ ativadas, células CD8+ ativadas, e células CD3+ ativadas. Disso, receptor IL-3 IRA também está implicado na indução de resposta inflamatória e imune. Assim, modalidades particulares da presente invenção são direcionadas para o uso de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 em condições ou doenças inflamatórias e imunes tais como, pancreatite, diabetes de tipo I (IDDM), câncer pancreático, pancreatite, Doença de Graves, doença inflamatória intestinal (IBD), Doença de Crohn, câncer intestinal e de cólon, diverticulose, doença autoimune, sepsia, transplante de órgãos ou de medula óssea; inflamação devido a trauma, cirurgia ou infecção; amiloidose; esplenomegalia; doença de enxerto versus hospedeiro; e onde inibição de
15 inflamação, supressão imune, redução de 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 receptor IL-3 IRA e expressão IL-31 em células imunes ativadas tais como células CD3+,
20 monócitos, CD4+ e CD 19+ ativadas mostrou que receptor IL-3 IRA pode estar envolvido nas reações defensivas imunes contra invasores estranhos: tais como microorganismos e fragmentos celulares, e poderia desempenhar um papel em respostas imunes durante inflamação e formação de câncer. Como tais, IL-31 e anticorpos anti-IL-31 da presente invenção que são agonísticos ou

antagonísticos para função de receptor IL-31 RA, podem ser usados para modificar resposta imune e inflamação.

Moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são úteis para:

5) Antagonizar ou bloquear sinalização via receptores compreendendo IL-31RA no tratamento de inflamação aguda, inflamação como um resultado de trauma, lesão de tecido, cirurgia, sepsia ou infecção, e doenças inflamatórias crônicas tais como asma, doença inflamatória intestinal (IBD), colite crônica, esplenomegalia, artrite reumatóide, episódios
10 inflamatórios agudos recorrentes (e.g., 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 sinalização via os receptores de receptor IL-3 IRA no tratamento de doenças autoimunes tais como IDDM,
15 esclerose múltipla (MS), lúpus eritematoso sistêmico (SLE), miastenia grave, artrite reumatóide, e IBD para prevenir ou inibir sinalização em células imunes (e.g. linfócitos, monócitos, leucócitos) via receptor IL-3 IRA (Hughes C et al., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Alternativamente anticorpos, tais como anticorpos monoclonais (MAb) para IL-31, também podem ser usados
20 como um antagonista para eliminar células imunes indesejadas para tratar doença autoimune. Asma, alergia e outra doença atópica pode ser tratada com um MAb contra, por exemplo, anticorpos anti-IL-31, receptores solúveis de receptor IL-3 IRA ou heterodímeros IL-31RA/CRF2-4, para inibir a resposta imune ou para eliminar células ofensivas. Bloqueio ou inibição de sinalização
25 via IL-3 IRA, usando os polipeptídeos e os anticorpos da presente invenção, também pode beneficiar doenças do pâncreas, rim, pituitária, e células neuronal. IDDM, NIDDM, pancreatite, e carcinoma pancreático podem se beneficiar. IL-3 IRA pode servir como um alvo para terapia de câncer com MAb onde um MAb antagonista inibe crescimento de câncer e seleciona

extermínio imune-mediado. (Holliger P, e Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Mabs para monômeros, homodímeros, heterodímeros e multímeros de receptor IL-3 IRA solúvel também podem ser úteis para tratar nefropatias tais como glomerulosclerose, neuropatia membranas, glomerulonefrite de várias origens, doenças fibroproliferativas do rim, bem como disfunção renal associada com SLE, IDDM, diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renais e outras doenças.

3) Agoniza ou inicia sinalização via os receptores IL-3 IRA no tratamento de doenças autoimunes tais como IDDM, MS, SLE, miastenia grave, artrite reumatóide, e IBD. IL-31 pode sinalizar linfócitos ou outras células imunes para diferenciar, alterar proliferação, ou mudar produção de citocinas ou proteínas de superfície celular que melhora autoimunidade. Especificamente, modulação de uma resposta de célula-T auxiliadora para alternar padrão de secreção de citocina pode desviar um resposta autoimune para melhorar doença (Smith JA et al., J. Immunol. 160:4841-4849. 1998). Similarmente, IL-31 pode ser usada para sinalizar, eliminar e desviar células imunes envolvidas em asma, alergia e doença atópica. Sinalização via receptor IL-3 IRA também pode beneficiar doenças do pâncreas, rim, pituitária e células neuronais. IDDM, NIDDM, pancreatite, e carcinoma pancreático podem se beneficiar. IL-3 IRA pode servir como um alvo para terapia de câncer pancreático com MAb onde uma sinalização de MAb inibe crescimento de câncer e seleciona extermínio imune-mediado (Tutt, AL et al., J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). Similarmente leucemias específicas de célula-T, linfomas, discrasia de célula de plasma (e.g., mieloma múltiplo), e carcinoma podem ser tratadas com anticorpos monoclonais (e.g., anticorpo neutralizador) para receptores solúveis compreendendo IL-3 IRA da presente invenção.

Geralmente, a dosagem de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 administradas(os) variará dependendo de tais fatores

como a idade, peso, altura, sexo, condição médica geral do paciente e história médica prévia do paciente. Tipicamente, é desejável proporcionar o paciente recipiente com uma dosagem de polipeptídeo IL-31 que esteja dentro da faixa de cerca de 1 pg/kg a 10 mg/kg (quantidade de agente / peso corporal do paciente), embora uma dosagem mais baixa ou mais alta possa ser administrada conforme ditem as circunstâncias. Uma pessoa experiente na arte pode determinar prontamente tais dosagens, e ajustes das mesmas, usando métodos conhecidos na arte.

Administração das moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 a um sujeito pode ser tópica, inalante, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intrapleural, intratecal, por perfusão através de um cateter regional, ou por injeção intralesional direta. Quando se administram proteínas terapêuticas por injeção, a administração pode ser por infusão contínua ou por bolo único ou bolos múltiplos.

Rotas de administração adicionais incluem oral, membrana-mucosal, pulmonar, e transcutânea. Liberação oral é adequada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteinóides, microesferas de policianoacrilato, e sistemas baseados em lipídeo (veja, 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 exequibilidade de uma liberação intranasal é exemplificada por um tal modo de administração de insulina (veja, por exemplo, Hinchcliffe e Ilium, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 199 (1999)). Partículas líquidas ou secas compreendendo IL-31 podem ser preparadas e inaladas com o auxílio de dispersadores de pó seco, geradores de aerossol de líquido, ou nebulizadores (*e.g.*, Pertit e Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton *et al*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Esta abordagem é ilustrada pelo sistema de manejo de diabetes AERX, que é um inalador eletrônico seguro com a mão esquerda que libera insulina aerossolizada para

dentro dos pulmões. Estudos têm mostrado que proteínas tão grandes quando 48.000 kDa têm sido liberadas através da pele em concentrações terapêuticas com o auxílio de ultra-som de frequência baixa, que ilustra a exequibilidade de administração transcutânea (Mitragotri *et al*, Science 269:850 (1995)).

- 5 Liberação transdermal usando eletroporação proporciona outro meio para administrar uma molécula tendo atividade de ligação em IL-31 (Potts *et al*, Pharm. Biotechnol. 10:213 (1997)).

Uma composição farmacêutica compreendendo moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 tendo atividade de ligação em IL-
10 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 veículo farmacêuticamente aceitável. Uma composição é dita em ser um "veículo farmacêuticamente aceitável" se sua administração puder ser tolerada por um
15 paciente recipiente. Solução salina tamponada com fosfato estéril é um exemplo de um veículo farmacêuticamente aceitável. Outros veículos adequados são bem conhecidos por aquelas pessoas na arte. Veja, por exemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995).

20 Para propósitos de terapia, moléculas tendo atividade de ligação em IL-31 e um veículo farmacêuticamente aceitável são administrados a um paciente em uma quantidade terapeuticamente efetiva. Uma combinação de uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo tendo atividade de ligação em IL-31 e um veículo farmacêuticamente aceitável é dita em ser
25 uma "quantidade terapeuticamente efetiva" se a quantidade administrada for fisiologicamente significativa. Um agente é fisiologicamente significativo se sua presença resulta em uma mudança detectável na fisiologia de um paciente recipiente. Por exemplo, um agente usado para tratar inflamação é fisiologicamente significativo se sua presença alivia pelo menos uma porção

da resposta inflamatória.

Uma composição farmacêutica compreendendo moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 pode ser fornecida na forma líquida, em uma forma de aerossol, ou em uma forma sólida. Formas líquidas, como ilustradas por soluções injetáveis, aerossóis, gotículas, soluções topológicas e suspensões orais. Formas sólidas exemplares incluem cápsulas, tabletes, e formas de liberação controlada. A última forma é ilustrada por 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 aplicações topológicas, e semelhante.

As moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 aqui mostradas(os) também podem ser formuladas(os) como imunolipossomos. Lipossomos contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na arte, tais como descritos em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); e Pat. U.S. Nos. 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomos com tempo de circulação aumentado são mostrados em Pat. U.S. No. 5.013.556.

Formulações terapêuticas das moléculas ligantes de IL-31 ou dos antagonistas de IL-31 são preparadas para armazenagem por misturação do anticorpo tendo o grau de pureza desejado com estabilizadores, excipientes ou veículos fisiologicamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Estabilizadores, excipientes ou veículos

aceitáveis são não tóxicos para pacientes recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecil-dimetil-benzil-amônio; cloreto de hexamatônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; fenol; butil-álcool ou benzil-álcool; alquil-parabenos tais como metil- ou propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menor do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como poli(vinil-pirrolidona); aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal tal como sódio; complexos de metal (e.g. complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos tais como Tween.TM., Pluronic.TM. ou poli(etileno-glicol) (PEG).

A formulação aqui também pode conter mais do que um composto ativo se necessário para indicação particular sendo tratada, preferivelmente aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente umas as outras. Por exemplo, pode ser desejável adicionalmente proporcionar anticorpos que se ligam em IL-31 em uma formulação. Alternativamente, ou em adição, a composição pode compreender um agent quimioterapêutico ou uma citocina. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são efetivas para o propósito intencionado.

Os ingredientes ativos também podem estar encerrados dentro de microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidróxi-metil-celulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metacrilato de metila),

respectivamente, em sistemas de liberação de droga coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são mostradas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

5 As formulações a serem usadas para administração in vivo precisam ser estéreis. Isto é prontamente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem

10 matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, e.g. filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(metacrilato de 2-hidróxi-etila), ou poli(vinil-álcool)), polilactídeos (Pat. U.S. No. 3.773.919), copolímeros de

15 ácido L-glutâmico e gama-L-glutamato de etila, copolímero de etileno - acetato de vinila não-degradável, copolímeros of ácido láctico - ácido glicólico degradáveis tais como Lupron Depot.TM. (microesferas injetáveis de leuprolida e copolímero de ácido láctico - ácido glicólico)), e poli-ácido-D-(-)-3-hidróxi-butírico. Embora polímeros tais como etileno - acetato de vinila e

20 ácido láctico - ácido glicólico permitam liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por período de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo por um tempo longo, podem se desnaturar ou agregar como um resultado de exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis mudanças

25 em imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser planejadas para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação descoberto for formação de ligação S-S intermolecular através de intercâmbio de tio-dissulfeto, estabilização poderá ser alcançada pela modificação de resíduos sulfidril, liofilização de soluções

ácidas, controle de teor de umidade, usando aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matriz de polímero específicas.

Polipeptídeos tendo atividade de ligação em IL-31 podem ser encapsulados dentro de lipossomos usando técnicas padrão de microencapsulação de proteína (veja, por exemplo, Anderson *et al*, Infect. Immun. 31:1099 (1981), Anderson *et al*, Cancer Res. 50:1853 (1990), eCohen *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving *et al*. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", em *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al*, Meth. Enzymol. 149:124 (1987)). Como observado acima, lipossomos terapeuticamente úteis podem conter uma variedade de compostos. Por exemplo, lipossomos podem compreender derivados lipídicos de poli(etileno-glicol) (Allen *et al*, Biochim. Biophys. Acta 1150:9 (1993)).

Microesferas de polímero têm sido projetadas para manter níveis sistêmicos altos de proteínas terapêuticas. Microesferas são preparadas a partir de polímeros degradáveis tais como poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLG), polianidridos, poli(orto-ésteres), polímeros de acetato de etil-vinila não biodegradáveis nas quais proteínas estão encerradas no polímero (Gombotz e Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers 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 *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders e Hendren (eds.), páginas 45-92 (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)). Nanoesferas revestidas com poli(etileno-glicol) (PEG) também podem proporcionar administração intravenosa de proteínas terapêuticas (veja, por exemplo, Gref *et al*, Pharm. Biotechnol. 10:167(1997)).

Outras formas de dosagem que podem ser planejadas por

aquelas pessoas experientes na arte, são como mostrado, por exemplo, por Ansel e Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995), e
 5 por Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Como uma ilustração, composições farmacêuticas podem ser fornecidas como um kit compreendendo um recipiente que compreende polipeptídeo IL-31 ou um antagonista de IL-31 (e.g., um anticorpo ou
 10 fragmento de anticorpo que se liga em um polipeptídeo IL-31). Polipeptídeos terapêuticos podem ser fornecidos na forma de uma solução injetável para doses únicas ou múltiplas, ou como um pó estéril que será reconstituído antes de injeção. Alternativamente, um tal kit pode incluir um dispersador de pó seco, gerador de aerossol líquido, ou nebulizador para administração de um polipeptídeo terapêutico.

15 Dentro de um aspecto a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado que se liga em IL-31 de humano, sendo que o dito anticorpo é um anticorpo humanizado derivado de anticorpo monoclonal produzido pelo híbrido depositado na American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de Patente em ATCC selecionada de: a) Designação de Depósito
 20 de Patente em ATCC de PTA-6815; b) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6816; c) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6829; d) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6830; e) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6831; f) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6871; g) Designação de Depósito
 25 de Patente em ATCC de PTA-6872; h) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6875; e i) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6873; e sendo que dito anticorpo compreende um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina que é uma IgG4 de humano. Em uma modalidade, o domínio constante de IgG4 de humano é uma forma mutada

estável em solução e com pouca ou nenhuma atividade de complemento. Em uma modalidade particular, o domínio de região constante de cadeia pesada de imunoglobulina é um domínio constante de IgG4 de humano com uma mutação de Ser para Pro na posição 241 (numeração de Kabat).

5 Dentro de outro aspecto estes anticorpos são usados para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pêfigo bolhoso, como aqui discutidas.

10 Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que o domínio de região constante de cadeia leve de imunoglobulina é selecionado do grupo consistindo da região constante de uma cadeia leve kappa ou lambda de imunoglobulina de humano. Preferivelmente, o domínio de região constante
15 de cadeia leve de imunoglobulina é a região constante e uma cadeia leve kappa de imunoglobulina de humano.

 Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que o domínio variável de cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve compreendem as seqüências de CDR de
20 clones 292.12.3.1, 292.84.1.6, 292.63.5.3, 294.144.3.5, 292.39.5.3, 292.51.5.2, 292.64.6.5.5, 292.105.4.1, 292.109.4.4, 292.118.6.4, e 292.72.3.1. As seqüências de CDR são mostradas nas Figuras e em Tabela 3, abaixo.

 Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada
25 compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 51, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 52 ou SEQ ID NO: 57, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:53; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de

aminoácidos SEQ ID NO: 54, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 55, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:56. Em uma modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade, quimiocinas tais como TARC ou MDC são medidas.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 51, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 58, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:59; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 61, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:62. Em uma modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade, quimiocinas tais como TARC ou MDC são medidas.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 63, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 64, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:65; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende

primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 66, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 67, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:68. Em uma modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade, quimiocinas tais como TARC ou MDC são medidas.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 69, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 79, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:71; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 72, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 73, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:74. Em uma modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade, quimiocinas tais como TARC ou MDC são medidas.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 75, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 76, e uma terceira seqüência de CDR consistindo

de SEQ ID NO:65; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 77, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 78, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:68. Em uma
5 modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade, quimiocinas tais como
10 TARC ou MDC são medidas.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado como aqui mostrado sendo que a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 80, uma segunda seqüência de CDR
15 consistindo de SEQ ID NO: 817, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:82; e b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 83, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 84, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID
20 NO:85. Em uma modalidade, o anticorpo é usado para tratar doenças incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, reações alérgicas induzidas por droga, prurite associada a vírus e vírus trópicos de pele, vitiligo, linfoma de célula-T cutânea, alopecia aerata, acne rosácea, acne vulgar, prurigo nodular, e pênfigo bolhoso, como aqui discutidas. Em outra modalidade,
25 quimiocinas tais como TARC ou MDC são medidas.

Dentro de um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal compreende uma região

variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; b) 5 uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 10 sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região 15 variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de 20 aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; i) uma região variável de 25 cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo inibe, bloqueia, ou neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO:2) com IL-3 IRA (SEQ ID NO:5). Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de: (a) um anticorpo monoclonal murino ou fragmento de anticorpo monoclonal murino; (b) um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo humanizado; e (c) um anticorpo monoclonal de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo adicionalmente compreende PEGuilação.

Dentro de outro aspecto, a invenção proporciona, um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreendendo uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada onde o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de: a) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; e b) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende

uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; iii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; iv) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; v) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; vi) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo inibe, bloqueia, ou neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO:2) com IL-3 IRA (SEQ ID NO:5). Dentro de outra modalidade o anticorpo monoclonal ou

fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de: (a) um anticorpo monoclonal murino ou fragmento de anticorpo monoclonal murino; (b) um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo humanizado; e (c) um anticorpo monoclonal de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo adicionalmente compreende PEGuilação. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de: (a) um anticorpo monoclonal murino ou fragmento de anticorpo monoclonal murino; (b) um anticorpo humanizado ou fragmento de anticorpo humanizado; e (c) um anticorpo monoclonal de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo adicionalmente compreende PEGuilação.

Dentro de outro aspecto, a invenção proporciona, um método de reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar inflamação em um mamífero compreendendo administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a

seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de

humano. Dentro de uma modalidade, administração do anticorpo ao mamífero reduz, bloqueia, inibe, ou neutraliza a produção de quimiocinas pró-inflamatórias. Dentro de uma outra modalidade, as quimiocinas pró-inflamatórias são TARC ou MDC. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região

variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; e) 5 uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 10 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região 15 variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

Dentro de outro aspecto, a invenção proporciona, um método de reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar prurite em um mamífero compreendendo administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou 20 fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a 25 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; c) uma

região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de uma modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada

selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de outra modalidade o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia

pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e h) uma
5 região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Dentro de outra modalidade, administração do anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal reduz, bloqueia, inibe, ou neutraliza dermatite. Dentro de uma
10 outra modalidade, a dermatite é dermatite atópica ou prurigo nodular.

Dentro de outro aspecto, a invenção proporciona um método de reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar arranhadura em um mamífero compreendendo administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em
15 um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia
20 pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de
25 SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; e) uma região variável de cadeia leve

compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de outra modalidade o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 e

sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano. Dentro de outra modalidade, o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a

5 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de: a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a

10 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; c) uma

15 região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; e) uma região variável de cadeia leve

20 compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; g)

25 uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a

seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para inibir proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética compreendendo

5 cultivar células de sangue periférico ou de medula óssea com uma composição compreendendo uma quantidade de uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) suficiente para reduzir proliferação ou diferenciação das células hematopoiéticas nas células de sangue periférico ou de medula óssea em comparação com as células de

10 sangue periférico ou de medula óssea cultivadas na ausência de receptor de citocina solúvel. Em uma modalidade o método para inibir proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como mostrado acima, sendo que as células hematopoiéticas e as células progenitoras hematopoiéticas são células

15 linfóides. Em outra modalidade o método para inibir diferenciação ou proliferação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como mostrado acima, sendo que as células linfóides são macrófagos ou células-T.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um

20 método de reduzir inflamação induzida por IL-31 compreendendo administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) suficiente para reduzir inflamação.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um

25 método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação compreendendo: (1) determinar um nível de uma molécula inflamatória; (2) administrar uma composição compreendendo uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) em um veículo farmacêutico aceitável; (3) determinar um nível de pós-administração

da molécula inflamatória; (4) comparar o nível da molécula inflamatória em etapa (1) com o nível da molécula inflamatória em etapa (3), sendo que uma falta de aumento ou uma diminuição do nível de molécula inflamatória é indicativo de supressão de uma resposta inflamatória. Em uma modalidade, o anticorpo é como mostrado acima, sendo que o anticorpo adicionalmente compreende um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, etiqueta de peptídeo, partícula magnética, droga, ou toxina.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para inibir proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética compreendendo cultivar células de sangue periférico ou de medula óssea com uma composição compreendendo uma quantidade de uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) suficiente para reduzir proliferação ou diferenciação das células hematopoiéticas nas células de sangue periférico ou de medula óssea em comparação com as células de sangue periférico ou de medula óssea cultivadas na ausência de receptor de citocina solúvel. Em uma modalidade o método para inibir proliferação ou diferenciação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como mostrado acima, sendo que as células hematopoiéticas e as células progenitoras hematopoiéticas são células linfóides. Em outra modalidade o método para inibir diferenciação ou proliferação induzida por IL-31 de células hematopoiéticas e progenitores de célula hematopoiética é como mostrado acima, sendo que as células linfóides são macrófagos ou células-T.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de reduzir inflamação induzida por IL-31 compreendendo administrar a um mamífero com inflamação uma quantidade de uma composição de uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui

mostradas(os) suficiente para reduzir inflamação.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de suprimir uma resposta inflamatória em um mamífero com inflamação compreendendo: (1) determinar um nível de uma molécula inflamatória; (2) administrar uma composição compreendendo uma moléculas de anticorpo ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) em um veículo farmacêutico aceitável; (3) determinar um nível de pós-administração da molécula inflamatória; (4) comparar o nível da molécula inflamatória em etapa (1) com o nível da molécula inflamatória em etapa (3), sendo que uma falta de aumento ou uma diminuição no nível de molécula inflamatória é indicativo de supressão de uma resposta inflamatória.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória na qual IL-31 desempenha um papel, compreendendo: administrar um antagonista de IL-31 ao mamífero de tal modo que a inflamação é reduzida, sendo que o antagonista é selecionado do grupo consistindo de uma moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 que especificamente se liga(m) em um polipeptídeo ou fragmento de polipeptídeo de IL-31 (SEQ ID NO:2). Em uma modalidade, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como mostrado acima, sendo que a doença é uma doença inflamatória crônica. Em outra modalidade, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como mostrado acima, sendo que a doença é uma doença inflamatória crônica selecionada do grupo consistindo de: doença inflamatória intestinal; colite ulcerativa; Doença de Crohn; dermatite atópica; eczema; e psoríase. Em outra modalidade, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como mostrado acima, sendo que a doença é uma doença inflamatória aguda. Em outra modalidade, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como mostrado acima, sendo que a doença é uma doença

inflamatória aguda selecionada do grupo consistindo de: endotoxemia; septicemia; síndrome de choque tóxico; e doença infecciosa. Em outra modalidade, o método de tratar um mamífero afligido com uma doença inflamatória é como mostrado acima, sendo que o anticorpo adicionalmente
 5 compreende um radionuclídeo, enzima, substrato, cofator, marcador fluorescente, marcador quimioluminescente, etiqueta de peptídeo, partícula magnética, droga, ou toxina.

Dentro de outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para detectar inflamação em um paciente, compreendendo: obter uma
 10 amostra biológica ou de tecido de um paciente; incubar a amostra biológica ou de tecido com moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 como aqui mostradas(os) sob condições nas quais as moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 se liga(m) em seu polipeptídeo complementar na amostra biológica ou de tecido; visualizar as moléculas ligantes de IL-31 ou
 15 antagonistas de IL-31 ligadas(os) na amostra biológica ou de tecido; e comparar os níveis de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 ligadas(os) na amostra biológica ou de tecido do paciente com uma amostra biológica ou de tecido de controle normal, sendo que um aumento no nível de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 ligadas(os) na amostra
 20 biológica ou de tecido do paciente em relação à amostra biológica ou de tecido de controle normal é indicativo inflamação no paciente.

A invenção é adicionalmente ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Determinação de Regiões Variáveis

Seqüências de regiões variáveis de cadeias leve e pesada foram determinadas na seguinte maneira:

Extração de RNA /Produção de "5' RACE Ready cDNA":

Linhagens de célula de hibridoma (aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células) foram coletadas por centrifugação após lavagem em 1X PBS. RNA foi purificado usando "Qiagen's RNeasy mini purification kit" de acordo com as instruções do fabricante. RNA resultante foi exibido sobre um E-Gel 1,2% para validação. Síntese de primeira fita de cDNA foi realizada usando "BD Biosciences BD SMART RACE cDNA Amplification Kit", que proporcionou "5' RACE Ready cDNA".

Amplificação de Sequências de Região Variável de Cadeias

Leve e Pesada:

"5' RACE ready cDNA" foi usado como modelo para PCR como descrito em "BD Biosciences BD SMART RACE cDNA Amplification Kit". Amplificações por PCR de ambas as cadeias pesada e leve usaram a 10X UPM ("Universal Primer Mix") proporcionada pelo kit como o 5' PCR oligonucleotídeo. Os 3' PCR oligonucleotídeos foram como segue;

kappa de camundongo (zc54289:5'-CGACTGAGCCACCTCCAGATGTAACTGCTCAC-3' SEQ ID NO: 28)

IgG1 de camundongo (zc54983:5'-CAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGG -3' SEQ ID NO: 29)

IgG2a de camundongo (zc55640: 5'-CAGGGGCCAGTGGATAGACCGATGGGG -3' SEQ ID NO: 30)

Os produtos de PCR de sequência de região variável de cadeias leve e pesada foram purificados em gel usando "GE Healthcare illustra GFX tm PCR DNA" e "Gel Be purification Kit" e clonados via "Invitrogen TOPO TA Cloning Kit". Oito colônias individuais por hibridoma por região variável foram selecionadas por PCR de colônia com iniciadores de kit M13R e M13F e submetidos ao seqüenciamento. Seqüenciamento foi realizado usando "ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reações para seqüenciamento foram purificadas usando "EdgeBioSystems Centriflex Gel Filtration

Cartridges" (Gaithersburg, MD) e corridos em um "ABI PRISM 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Dados de sequência resultantes foram montados e editados usando o programa de computador Sequencher v4.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI.)

5 Tabela 1 mostra as SEQ ID NO:s para as seqüências de regiões variáveis, que são adicionalmente descritas em Figuras 1 -4.

Tabela 1: Números de Listagem de Seqüências para Regiões Variáveis Leves e Variáveis Pesadas

Número do Clone	SEQ ID NO: da Região Variável de Cadeia Leve	SEQ ID NO: da Região Variável de Cadeia Leve com Seqüência de Sinal	SEQ ID NO: de Região Variável de Cadeia Pesada	SEQ ID NO: da Região Variável de Cadeia Pesada com Seqüência de Sinal
292.12.3.1	8	31	9	32
292.84.1.6	8 com Arg na substituída posição 42	31 com Arg na substituída posição 62	9 com substituições:- Thr na posição 50;- Ser na posição 69;- Asn na posição 77; e- Phe na posição 95	32 com substituições:- Thr na posição 50;- Ser na posição 88;- Asn na posição 95; e- Phe na posição 114
292.63.5.3	10	33	11	34
294.144.3.5	12	35	13	36
292.39.5.3	14	37	15	38
292.51.5.2	16	39	17	40
292.64.6.5.5	18	41	19	42
292.105.4.1	20	43	21	44
292.109.4.4	22	45	23	46
292.118.6.4	24	47	25	48
292.72.3.1	26	49	27	50

10 Tabela 2 mostra as SEQ ID NO:s para as seqüências das regiões variáveis, que são adicionalmente descritas em Figuras 1 -4.

Tabela 2: Números de Listagem de Sequências para CDRs de

Regiões Variáveis Leves e Regiões Variáveis Pesadas

Número do Clone	CDR1 Variável Pesada	CDR2 Variável Pesada	CDR3 Variável Pesada	CDR1 Variável Leve	CDR2 Variável Leve	CDR3 Variável Leve
292.12.3.1	SEQID NO: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1) RYWMQ	SEQ ID NO: 52: (CDR2 VH de 292.12.3.1): AIYPGDG DT RYSQKFK G	SEQ ID NO: 53: (CDR3 VH de 292.12.3.1): PDGYAA PY GMDY	SEQ ID NO: 54: (CDR1 VL de 292.12.3.1): RASGNIHN YL A	SEQ ID NO: 55: (CDR2 VL de 292.12.3.1): NAKTLAD	SEQ ID NO: 56: (CDR3 VL de 292.12.3.1): QHFWSTP WT
292.84.1.6	SEQID NO: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1) RYWMQ	SEQ ID NO: 57 (CDR2 VH de 292.84.1.6): TIYPGDGD T RYSQKFK G	SEQ ID NO: 53: (CDR3 VH de 292.12.3.1): PDGYAA PY GMDY	SEQ ID NO: 54: (CDR1 VL de 292.12.3.1): RASGNIHN YL A	SEQ ID NO: 55: (CDR2 VL de 292.12.3.1): NAKTLAD	SEQ ID NO: 56: (CDR3 VL de 292.12.3.1): QHFWSTP WT
292.72.3.1	SEQID NO: 51 (CDR1 VH de 292.12.3.1) RYWMQ	SEQ ID NO: 58 (CDR2 VH de 292.72.3.1): AIYPRDGD T RYSQKFK G	SEQ ID NO: 59: (CDR3 VH de 292.72.3.1): PDGSYAA PN GMEY	SEQ ID NO: 60: (CDR1 VL de 292.72.3.1): RASGSIHN YL A	SEQ ID NO: 61: (CDR2 VL de 292.72.3.1): NAETLAD	SEQ ID NO: 62: (CDR3 VL de 292.72.3.1): QHFWITP WT
292.63.5.3	SEQID NO: 63 (CDR1 VH de 292.63.5.3) TFIMS	SEQ ID NO: 64 (CDR2 VH de 292.63.5.3): TINSGGYY T FHPDSVK G	SEQ ID NO: 65 (CDR3 VH de 292.63.5.3): QEGWSSA YF SY	SEQ ID NO: 66: (CDR1 VL de 292.63.5.3): KSSQSLN GS NQKNYLA	SEQ ID NO: 67: (CDR2 VL de 292.63.5.3): FASTRDS	SEQ ID NO: 68: (CDR3 VL de 292.63.5.3): QQHYDTP YT
292.39.5.3	SEQID NO: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3) TYIMS	SEQ ID NO: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3): TINSGGYY T LYPDSVK G	SEQ ID NO: 71 (CDR3 VH de 292.39.5.3): QEGWSSA W FAY	SEQ ID NO: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLN SSN QKNYLA	SEQ ID NO: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEQ ID NO: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPY T
292.51.5.2	SEQID NO: 75 (CDR1 VH de 292.51.5.2) SFVMS	SEQ ID NO: 76 (CDR2 VH de 292.51.5.2): TINSGGYY S FHPDSVK G	SEQ ID NO: 65 (CDR3 VH de 292.63.5.3): QEGWSSA YF SY	SEQ ID NO: 77 (CDR1 VL de 292.51.5.2): KSSQSLN SSN QKNYLA	SEQ ID NO: 78 (CDR2 VL de 292.51.5.2): FTSTRES	SEQ ID NO: 68: (CDR3 VL de 292.63.5.3): QQHYDTP YT
292.64.6.5.5	SEQID NO: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3): TYIMS	SEQ ID NO: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3): TINSGGYY	SEQ ID NO: 71 (CDR3 VH de 292.39.5.3):	SEQ ID NO: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLN	SEQ ID NO: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEQ ID NO: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPY

		T LYPDSVK G	QEGWSSA W FAY	SSN QKNYLA		T
292.105.4.1	SEQID NO: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3) TYIMS	SEQ ID NO: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3): TINSGGYY T LYPDSVK G	SEQ ID NO: 71 (CDR3VH de 292.39.5.3): QEGWSSA W FAY	SEQ ID NO: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLLN SSN QKNYLA	SEQ ID NO: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEQ ID NO: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPY T
292.109.4.4	SEQID NO: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3) TYIMS	SEQ ID NO: 70 (CDR2 VH de 292.39.5.3): TINSGGYY T LYPDSVK G	SEQ ID NO: 71 (CDR3VH de 292.39.5.3): QEGWSSA W FAY	SEQ ID NO: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLLN SSN QKNYLA	SEQ ID NO: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEQ ID NO: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPY T
292.118.6.4	SEQID NO: 69 (CDR1 VH de 292.39.5.3) TYIMS	SEQ ID NO: 79 (CDR2 VH de 292.118.6.4) : TINSGGYY T IYPDSVKG	SEQ ID NO: 71 (CDR3VH de 292.39.5.3): QEGWSSA W FAY	SEQ ID NO: 72: (CDR1 VL de 292.39.5.3): NSSQSLLN SSN QKNYLA	SEQ ID NO: 73: (CDR2 VL de 292.39.5.3): FASTGES	SEQ ID NO: 74: (CDR3 VL de 292.39.5.3): QQHFSTPY T
294.144.3.5	SEQID NO: 80 (CDR1 VH de 292.144.3. 5): TYWIE	SEQ ID NO: 81 (CDR2 VH de 292.144.3.5) : EILPGRGT T NYNAKFQ G	SEQ ID NO: 82 (CDR3 VH de 292.144.3.5) : ESKLGDD DY	SEQ ID NO: 83: (CDR1 VL de 292.144.3.5) : SASSSVSY MH	SEQ ID NO: 84: (CDR2 VL de 292.144.3.5) : DTTKLAS	SEQ ID NO: 85: (CDR3 VL de 292.144.3.5) : FQGSEHPL T

Hibridomas, 292.12.3.1 e 292.84.1.6, expressam cadeias leve e pesada que compartilham um com o outro identidade de sequência extensiva. Os alinhamentos de sequência de aminoácidos de regiões variáveis de cadeias leve e pesada de 292.12.3.1 e 292.84.1.6 são mostradas em Figura 2. O alto grau de identidade de sequência compartilhada sugere que as regiões variáveis de cadeia leve são derivadas do mesmo gene de linhagem germinativa de região variável de cadeia leve, enquanto que as regiões variáveis de cadeia pesada também são derivadas de mesmo gene de linhagem germinativa de região variável de cadeia pesada. Adicionalmente, a identidade em todas as CDR3 e FR4 de cadeias leve e pesada indica utilização da mesma região JL na cadeia leve, e das mesmas regiões JH e D bem como as adições de nucleotídeo N e P na CDR3 de cadeia pesada. Ambos os hibridomas

292.12.3.1 e 292.84.1.6 expressam cadeias leve kappa, mas 292.12.3.1 expressa uma cadeia pesada de IgG1 enquanto que 292.84.1.6 expressa uma cadeia pesada de IgG2a. Parece que ambos estes hibridomas são derivados dos mesmos eventos de rearranjo de *loci* de imunoglobulina de célula-B inicial e que 292.84.1.6 é um resultado de uma subsequente comutação de classe para uma cadeia pesada de IgG2a. Quer antes de, quer depois de, comutação de classe, 292.12.3.1 e 292.84.1.6 divergiram pela incorporação de outras mutações somáticas que levaram à diferença de um aminoácido na cadeia leve e 4 diferenças de aminoácido na cadeia pesada.

Exemplo 2

Determinação de Sequência de Proteína Amino-Terminal

Sequenciamento de proteína N-terminal foi usado para determinar as seqüências de anticorpo de cadeias pesada e leve. Os anticorpos foram processados com e sem tratamento com piroglutamato-amino-peptidase (PGAP). Amostras não tratadas foram processadas pela adição de 100 picomoles (pmol) de proteína e água. Amostras tratadas com PGAP foram processadas pela adição de 100 pmol de proteína, água, 0,03 % SDS, tampão 5X PGAP (Takara Bio Inc., Japão) e enzima pGAP (1 mU) em tampão 1X PGAP. A reação com PGAP foi realizada por 10 minutos a 95°C. Este tratamento enzimático removeu os grupos ácido piroglutâmico N-terminalmente bloqueadores. Tampão redutor para SDS foi adicionado em ambas as amostras não tratadas e tratadas com pGAP e então as amostras foram aquecidas por 5 minutos em um banho de água em ebulição. As amostras foram corridas sobre um gel de SDS PAGE em gradiente. O gel foi transferido para uma membrana PVDF e corado com azul coomassie. Duas bandas visíveis foram observadas para cada amostra com pesos moleculares evidentes em SDS PAGE de 50 kDa e 25 kDa. Cada banda foi excisada e submetida ao seqüencialmente de proteína N-terminal. Vinte ciclos de seqüência foram realizados para determinar a seqüência.

Exemplo 3

Ensaio de Luciferase em Linhagens de Célula Epitelial Transformada de Humano via Infecção Transiente com um Gene Reporter STAT/SER Adenoviral

5 Inibição, redução, e/ou neutralização de atividade de IL-31 podem ser medidas pelo ensaio de luciferase. Por exemplo, linhagens de célula de humano transformadas podem ser semeadas em placas de fundo plano de 96 cavidades 10.000 células/cavidade em meio de crescimento regular como especificado para cada tipo de célula. No dia seguinte, as células
10 são infectadas com um construto repórter de adenovírus, KZ136, em uma multiplicidade de infecção de 5.000. O repórter KZ136 contém os elementos STAT em adição a um elemento de resposta sérico. O volume total é 100 μ L/cavidade usando DMEM suplementado com L-glutamina 2 mM (GibcoBRL), Piruvato de Sódio 1 mM (GibcoBRL) e suplemento de Insulina
15 - Transferrina - Selênio 1x (GibcoBRL) (daqui em diante referido como meio livre de soro). Células são cultivadas durante a noite.

 No dia seguinte, o meio é removido e substituído por 100 μ L de meio de indução. O meio de indução é IL-31 de humano diluída em meio livre de soro a 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125
20 ng/ml e 1,56 ng/ml. Um controle positivo de FBS 20% é usado para validar o ensaio e para garantir que a infecção por adenovírus é bem sucedida. As células são induzidas por 5 horas em cujo tempo o meio é aspirado. As células são então lavadas em 50 μ L/cavidade de PBS, e subseqüentemente lisadas em 30 μ L/cavidade de tampão de lise celular 1X (Promega). Após uma incubação
25 de 10 minutos na temperatura ambiente, 25 μ L/cavidade de lisado são transferidos para placas brancas opacas de 96 cavidades. As placas são então lidas em um Luminômetro usando integração de 5 segundos com 40 μ L/cavidade de injeção de substrato de luciferase(Promega).

Exemplo 4

Bioensaio de IL-31

Células BAF3 transfectadas com hzCYTOR17 (IL-31RA), hOSMRB, e KZ134 são crescidas para 5×10^5 e 1×10^6 células/mL. Células são lavadas com meio de ensaio (RPMI 1640, FBS 10%, L-Glutamina, Piruvato de Sódio, e Pen/Strep (todos da Gibco)) e ressuspensas a 3×10^5 células/mL em meio de ensaio. Em uma placa opaca de 96 cavidades, padrões hIL-31 são titulados em duplicata a partir de 600 pg/mL a 9,38 pg/mL em meio de ensaio via uma diluição serial de 1:2, de 100 µL/cavidade. Padrões de controle de qualidade são adicionados em duplicata na placa a 350 pg/mL e 35 pg/mL em 100 µL. Amostras de teste são muitas vezes diluídas 1:2 ou 1:4 e adicionadas em duplicata nas cavidades de amostra. 100 µL das células BAF3 lavadas são adicionados em cada cavidade para uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. A placa é incubada por 6-24 horas a +37°C em uma incubadora sob CO₂ 5%. A placa é centrifugada a 1.200RPM por 5 minutos, meio é expulso e 25 µL/cavidade de tampão de lise (Promega) são adicionados em cada cavidade. Após 10 minutos a placa é lida em um luminômetro (Berthold). O luminômetro adiciona 40 µL/cavidade de mistura de substrato de luciferase (Promega) e é integrada a luminescência por um período de 4 segundos. Valores de luminescência são exportados para uma planilha onde são analisados e convertidos em picogramas de IL-31 por 10^6 células por mL de volume.

Exemplo 5

Envolvimento de IL-31 em Iniciação e Perpetuação de Hipersensibilidade de Contato *In Vivo*

Método I

Camundongos BALB/c são pintados sobre o dorso médio barbeado com 25 µL de DNFB (2,4, dinitro-fluoro-benzeno, Sigma, St. Louis MO) 0,5% dissolvido em solução de acetona: azeite de oliva (4:1) usando um pipettor. Um grupo de controle de veículo recebe 25 µL de apenas acetona:

azeite de oliva. Após 5 dias, camundongos são anestesiados com isofluorana em uma câmara de inalação e ambos pavilhões de orelha de animais experimentais e de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para obter uma medição de linha base. Camundongos são então
5 desafiados pela aplicação de 10 μ L de DNFB 0,25% em acetona: azeite de oliva (4:1) em ambos os lados de cada orelha de todos os camundongos. Hipersensibilidade de contato é medida a 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita (desafiada) e a orelha esquerda (não desafiada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro.
10 Valores de fundo são determinados pela diferença em inchamento de orelha entre as orelhas de camundongos não-experimentados.

Sangue inteiro e soro para análise por FACS e/ou ELISA são colhidos antes da matança e orelhas são colhidas para histologia.

Método II (Induz respostas Th2)

15 Camundongos BALB/c são pintados sobre o dorso médio barbeado com 100 μ L de FITC (fluoresceína-isotiocianato) 0,5% em uma solução 1:1 de acetona/ftalato de dibutila (MSDS disponível usando pipettor nos dias 1, 2 e 8. No dia 13, camundongos são anestesiados com isofluorano em uma câmara de inalação e ambos pavilhões de orelha de animais
20 experimentais e de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para obter uma medição de linha base. Camundongos são então desafiados pela aplicação de 25 μ L de FITC 0,5% (em 1:1 acetona/ftalato de dibutila) na superfície dorsal de cada orelha. Hipersensibilidade de contato é medida a 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita
25 (desafiada) e a orelha esquerda (não desafiada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro. Valores de fundo são determinados pela diferença em inchamento de orelha entre as orelhas de camundongos não-experimentados. Sangue inteiro e soro para análise por FACS e/ou ELISA são colhidos antes da matança e orelhas são colhidas para histologia.

Método III (Induz respostas Th1)

Camundongos BALB/c são pintados sobre o dorso médio barbeado com 25 µL de oxazalona 2% (em acetona / azeite de oliva 4:1) usando pipettor. No dia 7, camundongos são anestesiados com isoflurano em uma câmara de inalação e ambos pavilhões de orelha de animais experimentais e de controle são medidas com um micrômetro de engenheiro (Mitutoyo) para obter uma medição de linha base. Camundongos são então desafiados pela aplicação de 8 µL de oxazalona na superfície dorsal de cada orelha. Hipersensibilidade de contato é medida a 24 h e 48 h mais tarde como a diferença entre a orelha direita (desafiada) e a orelha esquerda (não desafiada). Todas as medições são feitas com um micrômetro de engenheiro. Valores de fundo são determinados pela diferença em inchamento de orelha entre as orelhas de camundongos não-experimentados. Sangue inteiro e soro para análise por FACS e/ou ELISA são colhidos antes da matança e orelhas são colhidas para histologia.

Envolvimento de IL-31 na iniciação e na perpetuação de hipersensibilidade de contato são testadas usando as moléculas ligantes de IL-31 ou os antagonistas de IL-31 aqui descritas(os) contra IL-31 em ambas as fases de sensibilização e de desafio do experimento.

Exemplo 6

Envolvimento de IL-31 em Dermatite atópica *In Vivo*

Método I (Sensibilização de camundongos NC/Nga)

Camundongos NC/Nga de 4 semanas de idade (CRL, Japão) são alojados em condições de quarentena SPF por 4 semanas para aclimatização. Os camundongos são de aproximadamente 10-11 semanas de idade no início da sensibilização por antígeno. Camundongos são anestesiados com isoflurano e os dorsos são barbeados com tosquiadores elétricos. Aproximadamente 10 µg de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) (Indoor Biotechnologies, pedido especial) são injetados na nuca do pescoço 3

vezes por semana por 6 a 6 semanas até que os camundongos desenvolvam lesões de pele. Animais de controle recebem 10 µL de injeções intradérmicas de PBS 3 vezes por semana. O extrato de Dp é preparado de acordo com o método de Matsuoka e colegas. Matsuoka H., et al., *Allergy*: 58, 139 (2003).

5 Resumidamente, 595 mg de extrato de cultura esgotada liofilizada de Dp são dissolvidos em 12 mL de PBS estéril (Gibco). Dp é misturado em um tubo Falcon de 50 mL sobre um vascolejador por 30 minutos. O extrato é centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante é colhido e ali-

10 quetado em tubos de criofrasco de 1 mL e armazenados a -20°C. Os efeitos moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são medidos por inibição de arranhadura, coceira, e/ou dermatite.

Método II (Sensibilização de camundongos DO11.10)

Camundongos transgênicos DO11.10 são criados em uma colônia doméstica e são entre 9,5 e 14 semanas de idade no início da sensibilização por antígeno. 24 Horas antes da sensibilização epicutânea os

15 camundongos são anestesiados com isoflurano e o tronco inteiro (dorso e abdome) dos camundongos são barbeados com tosquiadores elétricos. Os camundongos são então pelados no dorso com fita cirúrgica Elastin (Johnson and Johnson). Placas de gaze de 1 cm² são umedecidas com 500 µg de

20 ovalbumina (Calbiochem 32467) ou com PBS estéril (Gibco) e aderidas sobre o lado inferior esquerdo dos camundongos com curativo "DuoDerm Extra Thin Dressing" (ConvaTec 187932). A placa e o curativo são então cobertos por um encobrimento de fita cirúrgica Elastin de modo que os camundongos não pudessem remover ou destruir as placas. As placas são usadas por 7 dias e

25 removidas. Os camundongos são descansados por duas semanas antes de sofrerem outra rodada de sensibilização epicutânea. Camundongos recebem um total de três sensibilizações de uma semana.

Os efeitos de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são medidos pela inibição de arranhadura, coceira, e/ou dermatite e/ou

uma redução em expressão de IL-31RA em queratinócitos.

Exemplo 7

Redução de TARC e MDC em Resposta ao Anticorpo Anti-IL-31 em modelos de AD em camundongo

5

Método I

Camundongos NC/Nga de seis semanas de idade (CRL Japão) são sensibilizados intradermalmente com 50 µg de extrato de ácaro de poeira (D. pteronyssinus, Indoor Biotechnologies) três vezes por semana sobre o dorso e classificados para lesões semelhantes a AD. Após 5 semanas de sensibilização os camundongos são mortos e as orelhas direitas foram excisadas e posicionadas dentro de uma cavidade única de uma placa de cultura de 48 cavidades (Corning) suplementada com RPMI+FBS 2% (GIBCO Invitrogen). Placas são posicionadas em incubadoras de umidade controlada sob CO₂ 5%. Sobrenadantes são colhidos após 24 horas e congelados a -20 °C até análise posterior.

15

Método II

Camundongos fêmeas NC/Nga de vinte semanas de idade (CRL Japão) são sensibilizados intradermalmente com 10 µg de SEB (Toxin Technology) na orelha e sobre o dorso três vezes por semana. Os camundongos são classificados para lesões semelhantes a AD. Após 5 semanas de sensibilização os camundongos são mortos e perfurações de biopsia de 6 mm foram tiradas da orelha injetada de cada camundongo e posicionadas dentro de uma cavidade única de uma placa de cultura de 48 cavidades (Corning) suplementada com RPMI+FBS 2% (GIBCO Invitrogen). Placas foram posicionadas em incubadoras de umidade controlada sob CO₂ 5%. Sobrenadantes são colhidos após 24 horas e congelados a -20 °C até análise posterior.

20

25

Grupos de camundongos em ambos os estudos são tratados com moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31

intraperitonealmente duas vezes por semana iniciando após 1 a 2 semanas de sensibilização.

Concentrações de TARC e MDC nas amostras de sobrenadante de 24 h são medidas por ELISA convencional (R&D Systems).

5

Exemplo 8

Administração de anticorpo neutralizador de IL-31

Camundongos fêmeas BALB/c normais (CRL) de aproximadamente 8 a 12 semanas de idade são implantados subcutaneamente com bombas osmóticas de 14 dias (Alzet, #2002) liberando 1 µg/dia de mL-31. Grupos de camundongos recebem injeções intraperitoneais (i.p.) de anticorpo monoclonal de rato anti-IL-31 de camundongo 10 mg/kg (200 µg/camundongo) duas vezes por semana iniciando 1 semana antes da liberação de IL-31. Grupos de controle de camundongos recebem injeções i.p. de veículo (PBS/BSA 0,1%) com os planejamentos de dosagem idênticos. Camundongos são classificados diariamente para alopecia e prurite usando os seguintes critérios: 0 = sem arranhadura, animal parece normal, 1 = adelgaçamento de pele em áreas pequenas, arranhadura notada, 2 = perda de pêlo menor (porções pequenas), arranhadura, 3 = perda de pêlo moderada, arranhadura, e 4 = perda de pêlo severa, excessiva arranhadura.

20

Os efeitos de moléculas ligantes de IL-31 ou antagonistas de IL-31 são medidos por um atraso no início dos sintomas de aproximadamente 5 a 7 dias e um escore total menor para alopecia e prurite.

Exemplo 9

Expressão de Anticorpos Monoclonais anti-IL-31 de Humano Quiméricos

25

Recombinantes

As seqüências de regiões variáveis de cadeias pesada e leve de dois anticorpos monoclonais de camundongo anti-IL-31 de humano separados, 292.12.3.1 e 292.63.5.3, foram obtidas por PCR. As seqüências de DNA foram determinadas e os construtos de expressão foram gerados

utilizando seqüências de DNA de região constante de humano.

Os construtos de expressão de cadeia leve consistiram de um promotor MPSV/CMV híbrido / intensificador dirigindo a expressão da região variável de camundongo quimérica anti-IL-31 de humano fusionada em uma região constante kappa de imunoglobulina.

Os construtos de expressão de cadeia pesada consistiram de um promotor MPSV/CMV híbrido / intensificador dirigindo a expressão da região variável de camundongo quimérica anti-IL-31 de humano fusionada em uma região constante de imunoglobulina IgG4 de humano com uma substituição de aminoácido na região de dobradiça, Serina 228 mudada para Prolina.

Os construtos de expressão de cadeias leve e pesada codificadores das cadeias leve e pesada quiméricas de cada hibridoma foram co-transfectados em células HEK 293F. Meio condicionado foi colhido após 4 dias. Análise de Western blot demonstrou anticorpo quimérico intacto de tamanho esperado sobre SDS-PAGE não redutor.

A capacidade de ligação em antígeno dos anticorpos quiméricos foi determinada por um protocolo baseado em ELISA para medir EC50 aparente (concentração efetiva para ligar 50% de antígeno em uma concentração fixa). O formato de ensaio utilizou uma imobilização de cabra anti-Fc de humano para captura de anticorpos monoclonais de humano de meio condicionado de cultura de célula não processada. Uma série de diluições de IL-31 biotinilada testou o parâmetro "C" de uma forma de 4 parâmetros que resulta na Kd aparente (ou EC50) quer em ng/mL quer em nM de IL31. A sensibilidade de ensaio é suficientemente alta que pode ser avaliado meio condicionado diluído de cultura celular de anticorpo quimérico ou anticorpo monoclonal. A Kd determinada por este método geralmente se aproxima da Kd medida para anticorpos monoclonais homogêneos, purificados medidos usando Biacore. Ambos anticorpos anti-IL31 quiméricos

mostram valores de EC_{50} similares comparados com anticorpo monoclonal de hibridoma de camundongo "parental" de controle 292.63.5.3 como mostrado em Tabela 3.

Tabela 3

5 Determinação de EC_{50} de Meio Condicionado de Transfecções Transientes de HEK 293F

Amostra	EC_{50} (ng/mL) ^d	EC_{50} (nM) ^d
Quimérico 292.63.5.3	1,3	0,08
Quimérico 292.12.3.1	2,0	0,12
Meio de controle de HEK 293F Não-transfectada	Sem ligação	Sem ligação
Anticorpo monoclonal de Controle 292.63.5.3 (Lote E9289)	4,3	0,26

^a Média de medida dupla

Do discutido acima, será reconhecido que, embora modalidades específicas da invenção tenham sido aqui descritas para propósitos de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se desviarem do espírito e do escopo da invenção. Conseqüentemente, a invenção não é limitada exceto pelas reivindicações anexadas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Siadak, Anthony W.
 Bilsborough, Janine
 Rene, Shirley

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

<130> 06-38PC

<140> PCTUS0777555

<141> 2007-09-04

<150> 60/824,403

<151> 2006-09-01

<150> 60/890,792

<151> 2007-02-20

<160> 85

<170> FastSEQ for Windows Version 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
 gcogtgattc ctttaagtaca tttttccaat gaataatctc agggaccctc catatgggct 659
 agtcccggga gggctgagat gtgaatttgt gaattacctt gaaaaacatt aggttattgt 719
 tattagtcctt ggtatattatg gaatgctttt cttctgcagg ctttaagtctt 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 ggtgcagtggt cctcagcagt 529
Thr Thr Cys

```

```

gcctgtcctt cgagggtga gcttgcaacc caggacttaa ctccaaaggg actgtgcggt 589
cattactagt catgttattt atgtttttat tttgtccact gaaatcttgt tctgctaccc 649
tgtagggact ggaagtggca gctatattta 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 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> Glu-Glu tag peptide

<400> 7

Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> VARIANTE
<222> (42)...(42)
<223> Xaa é Lys ou Arg

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Xaa Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Glu Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> VARIANTE
<222> (50)...(50)
<223> Xaa é Ala ou Thr

<220>
<221> VARIANTE
<222> (69)...(69)
<223> Xaa é Thr ou Ser

<220>
<221> VARIANTE
<222> (77)...(77)
<223> Xaa é Ser ou Asn

<220>
<221> VARIANTE
<222> (95)...(95)
<223> Xaa é Tyr ou Phe

<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 12
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

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

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

[illegible]

<210> 14

$\langle 211 \rangle$ 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

[illegible]

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Val Ser Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Thr Asn Met Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95
 His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Arg

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Ser Phe His Pro Asp Ser Val

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

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18

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

Arg

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

```

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

```

Arg 100 105 110

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95
 His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Arg

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
 20 25 30

```

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

```

```

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 26
Asp Ile Gln Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10           15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr
      20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
      35           40           45
Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65           70           75           80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp
      85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100           105

```

```

<210> 27
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 27
Gln Val Gln Val Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
  1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
      20           25           30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Ala Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe
      50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
      65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85           90           95
Ala Tyr Pro Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Pro Asn Gly Met Glu Tyr Trp
      100           105           110
Gly Gln Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser
      115           120

```

```

<210> 28
<211> 33
<212> DNA

```

<213> Mus musculus

<400> 28

cgactgagcc acctccagat gttaactgct cac

33

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

caggggccag tggatagaca gatggggg

28

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

caggggccag tggatagacc gatggggg

27

<210> 31

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> VARIANTE

<222> (62)...(62)

<223> Xaa é Lys ou Arg

<220>

<221> SINAL

<222> (1)...(20)

<400> 31

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

<210> 32

<211> 141

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> VARIANTE

<222> (69)...(69)

<223> Xaa é Ala ou Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (88)...(88)
 <223> Xaa é Thr ou Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (95)...(95)
 <223> Xaa é Ser ou Asn

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (114)...(114)
 <223> Xaa é Tyr ou Phe

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(19)

<400> 32
 Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Xaa Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Xaa
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Asn Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Xaa Cys Ala Phe Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 33
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(20)

<400> 33
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Asp
 20 25 30
 Met Ser Glu Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Ser Phe Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Arg
 130

<210> 34
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(19)

<400> 34
 Met Asn Phe Val Arg Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Phe Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Phe His Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Phe Ser Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 35
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(21)

<400> 35
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Asn Ser
 50 55 60
 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Thr Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
 100 105 110
 Ser Glu His Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile

115

120

125

<210> 36
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(19)

<400> 36
 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ala Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Glu Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Ser Lys Leu Gly Asp Asp Asp Tyr Trp Gln
 115 120 125
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 37
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(20)

<400> 37
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Arg
 130

<210> 38
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(19)

<400> 38
 Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 39
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SINAL
 <222> (1)...(20)

<400> 39
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Val Ser Phe Thr Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Met Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Arg
 130

<210> 40
 <211> 139
 <212> PRT

<213> Mus musculus

 $\langle 220 \rangle$

<221> SINAL

<222> (1) ... (19)

<400> 40

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

<210> 41

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

 $\langle 220 \rangle$

<221> SINAL

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (20)$

<400> 41

[illegible]

<210> 42

<211> 139

<212> PRT

<213> Mus musculus

 $\langle 220 \rangle$

<221> SINAL

<222> (1)...(19)

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SINAL

<222> (1)...(20)

<400> 43

```

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

```

<210> 44

<211> 139

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SINAL

<222> (1)...(19)

<400> 44

```

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

```

<210> 45

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SINAL

<222> (1)...(20)

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 139

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> SINAL

<222> (1)...(19)

<400> 46

```

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1          5          10          15

```

```

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

```

```

<210> 47
<211> 133
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SINAL
<222> (1)...(20)

```

```

<400> 47
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1              5              10              15
Gly Ala Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
      20              25              30
Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ile Cys Asn Ser Ser Gln Ser
      35              40              45
Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
      50              55              60
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Gly
65      70              75              80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Met Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
      85              90              95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
      100             105             110
Phe Cys Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
      115             120             125
Lys Leu Glu Ile Arg
      130

```

```

<210> 48
<211> 139
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SINAL
<222> (1)...(19)

```

```

<400> 48
Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1              5              10              15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
      20              25              30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe

```

```

      35              40              45
Lys Thr Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu
   50              55              60
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Ile Tyr Pro
   65              70              75              80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      85              90              95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
      100              105              110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
      115              120              125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      130              135

```

```

<210> 49
<211> 127
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SINAL
<222> (1)...(20)

```

```

<400> 49
Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
   1              5              10              15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
      20              25              30
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser
      35              40              45
Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
      50              55              60
Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
      65              70              75              80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser
      85              90              95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
      100              105              110
Ile Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      115              120              125

```

```

<210> 50
<211> 141
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> SINAL
<222> (1)...(19)

```

```

<400> 50
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
   1              5              10              15
Val Tyr Ser Gln Val Gln Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
      20              25              30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu
      35              40              45
Thr Arg Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      50              55              60
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
      65              70              75              80

```

Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala	Pro	Asn	Gly	Met
		115					120					125			
Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
	130					135					140				

<210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 51
 Arg Tyr Trp Met Gln
 1 5

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 52
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 53
 Pro Asp Gly Tyr Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 54
 Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 55
 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
 1 5

<210> 56

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 56
 Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 57
 Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58
 Ala Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 59
 Pro Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Pro Asn Gly Met Glu Tyr
 1 5 10

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 60
 Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 61
 Asn Ala Glu Thr Leu Ala Asp
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 62
 Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 63
 Thr Phe Ile Met Ser
 1 5

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 64
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Phe His Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 65
 Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Tyr Phe Ser Tyr
 1 5 10

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 66
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Gly Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 67
 Phe Ala Ser Thr Arg Asp Ser
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 68
 Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 69
 Thr Tyr Ile Met Ser
 1 5

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 70
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71
 Gln Glu Gly Trp Ser Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 72
 Asn Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 73
 Phe Ala Ser Thr Gly Glu Ser
 1 5

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 74
 Gln Gln His Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 75
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 75
 Ser Phe Val Met Ser
 1 5

<210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 76
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Ser Phe His Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 77
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 78
 Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 79
 Thr Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Tyr Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			

<210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 80
 Thr Tyr Trp Ile Glu
 1 5

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 81
 Glu Ile Leu Pro Gly Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 82
 Glu Ser Lys Leu Gly Asp Asp Asp Tyr
 1 5

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 83
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 84
 Asp Thr Thr Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 85

Phe Gln Gly Ser Glu His Pro Leu Thr
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia

pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e

5 j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27

e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

10 2. Método para reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar inflamação em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo
15 monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

20 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia
25 pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a

seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e

j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27

e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo ao mamífero reduz, bloqueia, inibe, ou neutraliza a produção de quimiocinas pró-inflamatórias.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as quimiocinas pró-inflamatórias são TARC ou MDC.

5. Método para reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar prurite em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal

compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

- 5 a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- 10 c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- 15 e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;
- 20 g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
- 25 i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e

j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27

5 é sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que administração do anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo reduz, bloqueia, inibe, ou neutraliza dermatite.

10 7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dermatite é dermatite atópica ou prurigo nodular.

8. Método para reduzir, bloquear, inibir, ou neutralizar arranhadura em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao mamífero um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a
15 sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia
20 pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a
25 sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

5 f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

10 h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia
15 pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; e

j) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27

20 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

9. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo inibe, bloqueia, ou neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO:2) com IL-3 IRA (SEQ ID NO:5).

25 10. Método de acordo com as reivindicações 2, 5, ou 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo inibe, bloqueia, ou neutraliza a interação de IL-31 (SEQ ID NO:2) com IL-3 IRA (SEQ ID NO:5).

11. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de

acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de:

- 5 (a) um anticorpo monoclonal murino ou fragmento de anticorpo murino;
- (b) um anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado; e
- (c) um anticorpo monoclonal humano.

10 12. Método de acordo com as reivindicações 2, 5, ou 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é selecionado do grupo consistindo de:

- (a) um anticorpo ou fragmento de anticorpo monoclonal murino;
- (b) um anticorpo ou fragmento de anticorpo humanizado; e
- (c) um anticorpo monoclonal humano.

15 13. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo adicionalmente compreende PEGuilação.

20 14. Método de acordo com as reivindicações 2, 5, ou 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo adicionalmente compreende PEGuilação.

25 15. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada onde o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de:

- a) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo

monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

5 i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e

ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; e

10 b) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

15 i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

20 ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

iii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

25 iv) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

v) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia

pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

vi) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

5 vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e

vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia
10 pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25

e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

16. Método de acordo com as reivindicações 2, 5, ou 8, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de
15 anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada onde o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal é selecionado do grupo consistindo de:

a) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a
20 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a
25 seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e

ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; e

b) um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal que compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

iii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

iv) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

v) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

vi) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e

viii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia

pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25

e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

17. Anticorpo monoclonal ou método de acordo com as reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

a) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

18. Anticorpo monoclonal ou método de acordo com as reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo compete pela ligação específica em um polipeptídeo compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo monoclonal compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada selecionada do grupo consistindo de:

a)) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

c) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

5 d) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

e) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

10 f) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

15 g) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e

h) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25

20 e sendo que o anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo é usado conjuntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.

19. Anticorpo isolado que se liga a IL-31 humano, caracterizado pelo fato de que dito anticorpo é um anticorpo humanizado derivado do anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma depositado na American Type Culture Collection tendo a Designação de Depósito de
25 Patente em ATCC selecionada de:

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

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

c) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6829;

d) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6830;

e) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6831;

f) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6871;

g) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6872;

h) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6875; e

i) Designação de Depósito de Patente em ATCC de PTA-6873;

e sendo que dito anticorpo compreende um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina que é uma IgG4 de humano. Em uma modalidade, o domínio constante de IgG4 de humano é uma forma mutada estável em solução com pouca ou nenhuma atividade ativadora de complemento. Em uma modalidade particular, o domínio de região constante de cadeia pesada de imunoglobulina é um domínio constante de IgG4 de humano com uma mutação de Ser para Pro na posição 241 (numeração de Kabat).

20. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o domínio de região constante de cadeia leve de imunoglobulina é selecionado do grupo consistindo de a região constante de uma cadeia leve kappa ou lambda de imunoglobulina.

21. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 51,

uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 52 ou SEQ ID NO: 57, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:53; e

b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 54, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 55, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:56.

22. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 51, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 58, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:59; e

b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 60, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 61, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:62.

23. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 63, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 64, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:65; e

b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 66, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 67, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:68.

24. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira

seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 69, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 79, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:71; e

5 b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 72, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 73, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:74.

25. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

10 a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 75, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 76, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:65; e

15 b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 77, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 78, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:68.

26. Anticorpo isolado como aqui mostrado, caracterizado pelo fato de que:

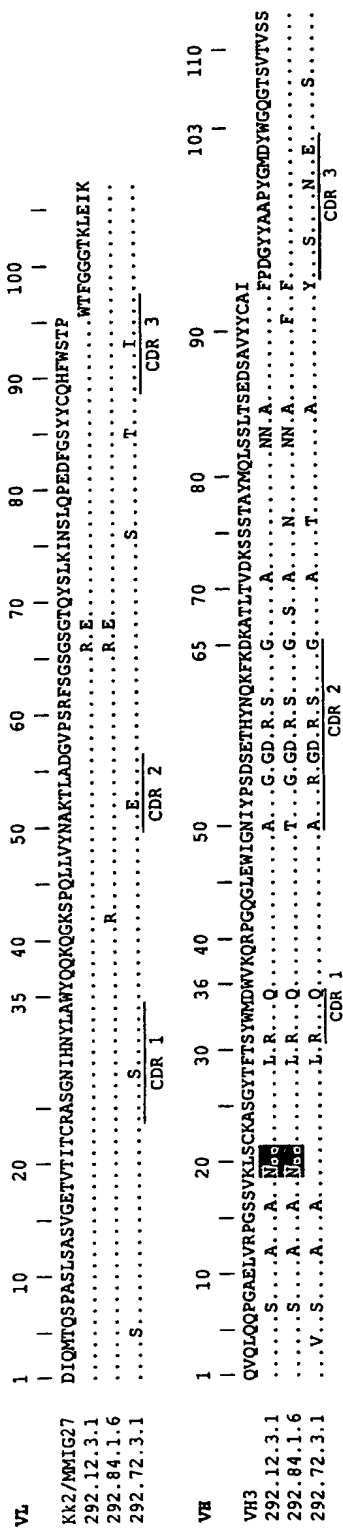
20 a) o domínio variável de cadeia pesada compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 80, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 817, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:82; e

25 b) o domínio variável de cadeia leve compreende primeira seqüência de CDR consistindo de seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 83, uma segunda seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO: 84, e uma terceira seqüência de CDR consistindo de SEQ ID NO:85.

[illegible][illegible]

[illegible]

Figure 4: Alinhamento de seqüências de aminoácidos preditas de VL e VH de hibridomas de camundongo anti-IL-31 de humano a partir de Bin 1B. Resíduos são numerados e CDRs são definidas de acordo com Kabat. As CDRs estão sublinhadas. Motivos de carboidrato N-ligados estão realçados em cinza. Um " " indica identidade com seqüência acima.



RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE ANTICORPO, MÉTODOS PARA REDUZIR, BLOQUEAR, INIBIR, OU NEUTRALIZAR INFLAMAÇÃO, PRURITE E ARRANHADURA EM UM MAMÍFERO, E, ANTICORPO ISOLADO”

São obtidas novas composições derivadas de sítios de ligação em antígeno de imunoglobulinas tendo afinidade por IL-31. As composições exibem propriedades de ligação imunológicas de moléculas de anticorpo capazes de ligação especificamente em uma IL-31 de humano. São obtidas regiões CDR derivadas de mesmos ou diferentes grupos de imunoglobulinas. Também são obtidos polipeptídeos de cadeia única nos quais os domínios VH e VL estão ligados. As moléculas sFv podem incluir grupos de polipeptídeo ancilares que podem ser bioativos, ou que proporcionam um sítio de ligação para outros grupos úteis. As composições são úteis em ensaios de ligação específicos, esquemas de purificação por afinidade, seleção de toxina ou droga, imagem, e agentes terapêuticos imunológicos ou genéticos para doenças inflamatórias. A invenção deste modo proporciona polipeptídeos novos, os DNAs codificadores daqueles polipeptídeos, cassetes de expressão compreendendo aqueles DNAs, e métodos de indução da produção dos polipeptídeos. A invenção adicionalmente proporciona as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis dos anticorpos monoclonais e o uso destes anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo juntamente com uma molécula IgG4 Fc de humano.