

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 055**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06846989 .9**
96 Fecha de presentación: **20.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1966238**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Variantes de la interleucina-12p40 con estabilidad mejorada**

30 Prioridad:
30.12.2005 US 755382 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2012

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**WEBSTER, Gordon D.;
MCKENZIE, Suzanne P.;
LO, Kin-Ming y
STEIN, Pascal André**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 384 055 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de la interleucina-12p40 con estabilidad mejorada.

Área de la invención.

5 La presente invención hace referencia, en general, a proteínas de IL-12p40, incluyendo proteínas de fusión que contengan IL-12p40, modificadas para mejorar su estabilidad. En particular, las proteínas IL-12p40 de la invención eliminan un sitio proteolítico en la región de Lys260 y Arg261 en la subunidad p40.

Antecedentes de la invención.

10 La interleucina-12 (IL-12) es una citocina inflamatoria que se produce, en respuesta a la infección, por parte de una variedad de células del sistema inmunológico, incluyendo células fagocíticas, linfocitos B y células dendríticas activadas (Colombo y Trinchiero (2002), *Cytokine & Growth Factor Reviews* (Informes sobre Citocinas y Factor de Crecimiento) 13: 155-168). La IL-12 desempeña un papel esencial en la mediación de la interacción de las armas innatas y adaptativas del sistema inmunológico, actuando sobre los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), aumentando la proliferación y actividad de los linfocitos citotóxicos y la producción de otras citocinas inflamatorias, especialmente el interferón- γ (IFN- γ).

15 La IL-12 es una molécula heterodimérica compuesta de una cadena α (la subunidad p35, IL-12p35) y una cadena β (la subunidad p40, IL-12p40), enlazadas de forma covalente mediante un puente disulfuro para formar el heterodímero de 74 kDa biológicamente activo. Las secuencias de aminoácidos de la IL-12p35 y de la IL-12p40 de una IL-12 humana madura (tipo silvestre), se encuentran representadas en las Figuras 1 (SEQ ID NO:1) y 2 (SEQ ID NO:2), respectivamente.

20 La interleucina-23 (IL-23) es una molécula heterodimérica con puente de disulfuro, estrechamente relacionada con la IL-12, en el sentido en que presenta la misma cadena β de IL-12p40 que la IL-12, pero una única cadena α (la subunidad p 19, IL-23p19) (Oppmann et al., (2000), *Immunity* (Inmunidad), 13: 715-725). Al igual que la IL-12, la IL-23 es producida por células fagocíticas y células dendríticas activadas, y se cree que está implicada en el reclutamiento y activación de una serie de células inflamatorias (Langrish et al., (2004) *Immuno/ Rev.*, 202: 96-105).
25 La secuencia de aminoácidos de la IL-23p19 de una IL-23 humana madura se representa en la Figura 3 (SEQ ID NO:3).

30 Para que los inmunocitos secreten heterodímeros de IL-12 o IL-23 biológicamente activos, se requiere la expresión concomitante de las subunidades α y β en la misma célula. La secreción únicamente de la IL-12p35 o IL-23p19 por parte de los inmunocitos no se ha observado, mientras que las células que producen el heterodímero de IL-12 o IL-23 biológicamente activo secretan la subunidad p40, de forma libre, en un valor superior de 10 a 100 veces por encima del heterodímero (D'Andrea et al. (1992), *J. Exp. Med.*, 176: 1387-98, Oppmann et al., (2000), *Immunity*, 13: 715-725). Además, se ha observado en ratones que, incluso en la ausencia de una subunidad α , las células pueden producir un homodímero de IL-12p40 biológicamente activo (Hikawa et al. (2004), *Neuroscience* (Neurociencia), 129: 75-83).

35 La presencia de IL-12 endógena ha mostrado ser necesaria para la resistencia inmunológica a un amplio conjunto de patógenos, además de a tumores transplantados y químicamente inducidos (Gately et al. (1998), *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 495-521). Se ha demostrado que la IL-12 presenta una potente actividad antitumoral basada en la inducción del IFN- γ y la activación de las células efectoras, tales como CD8+ linfocitos T y células NK (Brunda et al. (1993), *J. Exp. Med.*, 178: 1223-30). Como resultado de su demostrada actividad antitumoral, la IL-12 ha sido probada en ensayos clínicos humanos como un agente inmonoterapéutico para el tratamiento de una amplia variedad de tipos de cáncer (Atkins et al. (1997), *Clin. Cancer Res.*, 3: 409-17; Gollob et al. (2000), *Clin. Cancer Res.*, 6: 1678-92; y Hurteau et al. (2001), *Gynecol. Oncol.*, 82: 7-10), incluyendo cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovarios, melanoma y linfoma de linfocitos T, y es un adyuvante para vacunas contra el cáncer (Lee et al. (2001), *J. Clin. Oncol.* 19: 3836-47).

45 Para la IL-12 o la IL-23, la producción de proteína recombinante en su forma heterodimérica correctamente plegada y biológicamente activa, requiere de la expresión concurrente tanto de la subunidad α , como de la IL-12p40 en la línea de producción celular. La proteína recombinante purificada, sin embargo, muestra un grado de heterogeneidad que es el resultado del corte proteolítico en la región C-terminal de la IL-12p40. La inestabilidad de la proteína IL-12 o IL-23 puede dar lugar a problemas en su producción y uso clínico como agente terapéutico. Por lo tanto, existe la
50 necesidad en el estado del arte de variantes mejoradas recombinantes de IL-12 o IL-23 que produzcan una proteína homogénea más resistente al corte proteolítico.

Resumen de la Invención.

- La invención proporciona variantes de las subunidades de la IL-12p40 humana (variantes de p40) que han mejorado su estabilidad, en comparación con las proteínas IL-12p40 de tipo silvestre. En estas variantes de p40, la región C-terminal, que es, de manera habitual, sensible al corte proteolítico, ha sido modificada para ser más resistente a la digestión por parte de las proteasas. De manera específica, las variantes de p40 de la invención incluyen modificaciones en el diseño de los aminoácidos en el dominio D3, destinadas a evitar la creación de epítomos de linfocitos T potenciales que podrían hacer que las proteínas variantes se vuelvan inmunogénicas y desencadenar respuestas de anticuerpos en humanos. Como resultado, las variantes de p40 de la invención han mejorado sus propiedades como agentes terapéuticos sobre las proteínas IL-12p40 de tipo silvestre en referencia a su producción, formulación, y farmacocinética.
- 5 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona variantes de la IL-12 p40 humana con una modificación de aminoácidos en una o más posiciones que corresponden a los residuos 258-266 de IL-12 p40 humana madura. Ciertas realizaciones de la presente invención están basadas, en parte, en la apreciación de que una modificación o modificaciones de aminoácidos de acuerdo a la invención, presenta el beneficio en particular de eliminar el sitio proteolítico entre Lys260 y Arg261.
- 10 De acuerdo a la presente invención, las modificaciones de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a los residuos 258-266 pueden ser deleciones, sustituciones, o inserciones. Más aún, las sustituciones de aminoácidos que reemplazan aminoácidos básicos con aminoácidos no básicos, pueden ser utilizadas para crear variantes de acuerdo a la invención.
- 15 De acuerdo a la invención, las variantes comprenden sustituciones al menos en las posiciones Lys260, Ser259 y Arg261. En particular, las variantes de la invención presentan las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, y Arg261Thr. En una realización adicional, las variantes de la invención incorporan las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr y Lys264Gly, mientras que suprimen Lys263 y Asp265. De manera alternativa, una variante de la presente invención incorpora las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr, y Lys264Gly, mientras que suprime Lys263, Lys264 y Asp265.
- 20 En otras realizaciones de acuerdo a la invención, una variante que incluye una sustitución que reemplaza a Lys260, incluye, de manera alternativa, sustituciones adicionales en uno o más de Lys258, Ser259, Arg261, Lys263, y Lys264. Por ejemplo, en una realización, una variante incluye las sustituciones Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp, y de manera opcional Lys263Ser y Lys264Gly.
- 25 En realizaciones adicionales, además de las sustituciones en Ser259, Lys260, y Arg261, uno o más residuos correspondientes a Lys263, Lys264, Asp265, y Arg266 se suprimen, mientras que en otra realización, uno o más de Lys263, Lys264, Asp265, y Arg266 se sustituyen con un aminoácido no básico. En una realización adicional, la sustitución en Lys264 es Lys264Gly y, de manera opcional, Lys263 y Asp265 se suprimen.
- 30 Debe entenderse por aquellos expertos en el arte que las variantes de p40 y las porciones activas de las mismas que incorporen una variante tal como se describe en el presente documento, se encuentran en el alcance de la presente invención. De manera similar, las proteínas IL-12 y las porciones activas de las mismas que contienen una variante de p40 (variantes de IL-12), también se encuentran en el alcance de la invención. La presente invención además abarca proteínas de fusión que incluyen variantes de la IL-12 de la invención y una fracción seleccionada del grupo que consiste en una fracción de anticuerpo, una citocina que no sea IL-12, o una porción activa de la misma.
- 35 De manera similar, las proteínas IL-23 y las porciones activas de las mismas que contengan una variante de p40 (variantes de IL-23), también se encuentran dentro del alcance de la invención. La presente invención además abarca proteínas de fusión que incluyan variantes de IL-23 de la invención, y una fracción seleccionada del grupo que consiste en una fracción de anticuerpo, una citocina no IL-23, o una porción activa de la misma.
- 40 En otro aspecto, la invención hace referencia a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de p40, variantes de IL-12, y variantes de IL-23 de la invención. La presente invención además abarca una célula, por ejemplo una célula procariótica, que incluya un ácido nucleico del tipo mencionado.
- 45 La presente invención presenta también métodos para la realización de tales variantes de p40, variantes de IL-12, variantes de IL-23 y proteínas de fusión que contengan estas fracciones.
- 50 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de utilización de las variantes de la invención y los ácidos nucleicos que codifican las mismas. Por ejemplo, la invención abarca un método para el tratamiento de un paciente que incluye la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una variante de p40 de la invención o una porción activa de la misma.

Lo expresado anteriormente, y otras características y ventajas de la presente invención, además de la invención en sí misma, se entenderá por completo a partir de las siguientes figuras, descripción y reivindicaciones.

En resumen la presente invención hace referencia a:

- 5
- Una variante de la IL-12 p40 (I) que consta de la delección o sustitución de un aminoácido en una o más posiciones correspondientes a los residuos en las posiciones 258-266 de la IL-12 p40 humana madura parental, en donde la variante comprende sustituciones al menos en las posiciones Lys260, Ser259 y Arg261.
 - La respectiva variante (I) que comprende las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, y Arg261Thr, comprendiendo de manera adicional la sustitución Lys264Gly.
- 10
- La respectiva variante (I) que comprende las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr y Lys264Gly, en donde además uno o ambos residuos Lys263 y Asp265 se suprimen.
 - La respectiva variante (I), en donde uno o más residuos correspondientes a Lys263, Lys264, Asp265, y Arg266 se suprimen.
 - La respectiva variante (I) que además comprende una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Lys263, Lys264, Asp265, y Arg266, en donde el residuo de aminoácido original correspondiente se reemplaza por un aminoácido no básico.
- 15
- La respectiva variante (I) que comprende
 - (i) las siguientes sustituciones: Ser259Asp, Lys260Asn, y Arg261Thr, y
 - (ii) las siguientes delecciones: Lys263, Lys264 y Asp265,en donde dichas posiciones están relacionadas con la molécula de tipo silvestre no modificada,

20

formando, de ese modo, la formación de secuencia: Lys – Asp – Asn – Thr – Glu – Gly – Arg en las posiciones 258 – 264 de la variante.

 - La respectiva variante (I) que comprende las siguientes sustituciones:
Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp,

25

formando, de ese modo, la formación de secuencia: Gln – Asp – Gln – Asp – Glu – Lys – Lys – Arg en las posiciones 258 – 265 de la variante.

 - La respectiva variante (I) que comprende las siguientes sustituciones:
Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp, Lys263Ser, Lys264Gly,

30

formando, de ese modo, la formación de secuencia: Gln – Asp – Gln – Asp – Glu – Ser – Gly – Arg en las posiciones 258 – 265 de la variante.

 - Una proteína IL-12 (II) o un fragmento de la misma que contiene la variante (I) tal como se ha indicado con anterioridad.
 - Una proteína IL-12 (III) o un fragmento de la misma que contiene la variante (I) tal como se ha indicado con anterioridad.

35

 - Una proteína de fusión que consta de la variante (I) o una proteína (II) o (III), y un anticuerpo o porción activa del mismo.
 - Una proteína de fusión respectiva, en donde dicha variante o dichas proteínas se fusionan al extremo C-terminal de dicho anticuerpo o porción de anticuerpo.
 - Un ácido nucleico que codifica una variante o una proteína o una proteína de fusión como se ha indicado.

- Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico tal como se ha indicado, y una célula hospedadora que produce dicha variante, dicha proteína o dicha proteína de fusión y que comprende dicho vector de expresión.

5 • Una composición farmacéutica que comprende, en una cantidad farmacológicamente efectiva, una proteína o proteína de fusión tal como se ha indicado con anterioridad, de manera opcional junto con un diluyente o excipiente portador farmacéuticamente aceptable.

- Una composición farmacéutica respectiva para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad autoinmune.

Breve descripción de los dibujos.

10 La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos madura de la cadena α , es decir, la subunidad p35, de una IL-12 humana madura (tipo silvestre) (SEQ ID NO:1).

La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos madura de la cadena β , es decir, la subunidad p40, de una IL-12 humana madura (tipo silvestre) (SEQ ID NO:2). El dominio D3, que corresponde a las posiciones 211-306 (SEQ ID NO:26), está en cursiva, y el fragmento del péptido que corresponde a las posiciones 258-266 está subrayado (SEQ ID NO:5), con Lys260 y Arg261 destacadas en negrita.

15 La Figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena α , es decir, la subunidad p 19, de una IL-23 humana madura (tipo silvestre) (SEQ ID NO:3).

20 La Figura 4A muestra un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) para varios lotes purificados de IL-12 humana producidos como proteínas de fusión de anticuerpos (carriles 1 – 8), mientras que la Figura 4B muestra el análisis en gel SDS-PAGE para varios lotes purificados de IL-23 humana producidos como proteínas de fusión de anticuerpos (carriles 1 – 3). La subunidad IL-12p35 y la IL-23p19 se encuentra enlazada de forma covalente a la cadena pesada del anticuerpo. La banda 6kD se encuentra indicada por una flecha. Los pesos moleculares (kD) están indicados para los marcadores (carril M).

La Figura 5 representa la secuencia de aminoácidos del fragmento de péptido C-terminal de la subunidad de IL-12p40 humana madura (tipo silvestre). El fragmento comienza en Arg261 (SEQ ID NO:4).

25 La Figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de un fragmento de péptido que corresponde a las posiciones 258-266 de una subunidad de IL-12p40 humana madura (tipo silvestre) (SEQ ID NO:5).

30 Las Figuras 7.1 y 7.2 representan un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las subunidades de la IL-12p40 de varios mamíferos que incluyen ser humano, babuino (*Papio anubis*), mono rhesus (*Macaca mulatta*), mangabey (*Cercocebus torquatus*), perro (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), caballo (*Equus caballus*), cerdo (*Sus scrofa*), vaca (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*), oveja (*Ovis aries*), ciervo (*Cervus elaphus*), búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), hámster (*Mesocricetus auratus*), conejillo de Indias (*Cavia porcellus*), rata algodonera (*Sigmodon hispidus*), rata (*Rattus norvegicus*), y ratón (*Mus musculus*). Los dos aminoácidos en negrita indican el sitio de corte proteolítico.

35 La Figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V1, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:6). La secuencia modificada se encuentra subrayada.

La Figura 9 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V2, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:7). La secuencia modificada se encuentra subrayada.

40 La Figura 10 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V3, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:8). La secuencia modificada se encuentra subrayada.

45 La Figura 11 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V4, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:9). La secuencia modificada se encuentra subrayada.

La Figura 12 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V5, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:10). La modificación se encuentra subrayada.

La Figura 13 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V6, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:11). Las modificaciones se encuentran subrayadas.

5 La Figura 14 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V7, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:12). La modificación se encuentra subrayada.

La Figura 15 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V8, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:13). La modificación se encuentra subrayada.

10 La Figura 16 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V9, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:14). La modificación se encuentra subrayada.

15 La Figura 17 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V10, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:15). La modificación se encuentra subrayada.

La Figura 18 representa la secuencia de aminoácidos de una variante, a la que se hace referencia de aquí en adelante como p40V11, de una subunidad de IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO:16). Las modificaciones se encuentran subrayadas.

20 La Figura 19 representa la secuencia de ácido nucleico que codifica la longitud total (tipo silvestre) de la subunidad de IL-12p40 humana (SEQ ID NO:21).

25 La Figura 20 representa la secuencia de ácido nucleico de un fragmento de nucleótido sintético, a la que se hace referencia de aquí en adelante como V1V2, que codifica porciones de las variantes de p40 p40V1 y p40V2. El fragmento V1V2 abarca un fragmento V1 que incluye una región (subrayada) que codifica la SEQ ID NO:17. Le sigue una secuencia conectora (caracteres en minúsculas), y posteriormente, un fragmento V2 que incluye una región (subrayada) que codifica la SEQ ID NO:18.

30 La Figura 21 representa la secuencia de ácido nucleico de un fragmento de nucleótido sintético, a la que se hace referencia de aquí en adelante como V3V4, que codifica las porciones de las variantes de p40 p40V3 y p40V4. El fragmento V3V4 abarca un fragmento V3 que incluye una región (subrayada) que codifica la SEQ ID NO:19. Le sigue una secuencia conectora (caracteres en minúsculas), y posteriormente, un fragmento V4 que incluye una región (subrayada) que codifica la SEQ ID NO:20.

35 La Figura 22 representa la secuencia de ácido nucleico de un fragmento de nucleótido sintético, a la que se hace referencia de aquí en adelante como V5V6, que codifica las porciones de las variantes de p40 p40V5 y p40V6. El fragmento V5V6 abarca un fragmento V5 que incluye una sustitución de codón (subrayada) que codifica Arg261Ala. Le sigue una secuencia conectora (caracteres en minúsculas), y posteriormente, un fragmento V6 que incluye sustituciones de codón (subrayada) que codifican Lys 260Ala y Arg261Ala.

40 La Figura 23 representa la secuencia de ácido nucleico de un fragmento de nucleótido sintético, a la que se hace referencia de aquí en adelante como V7V8, que codifica las porciones de las variantes de p40 p40V7 y p40V8. El fragmento V7V8 abarca un fragmento V7 que incluye una sustitución de codón (subrayada) que codifica Lys260Ala. Le sigue una secuencia conectora (caracteres en minúsculas), y posteriormente, un fragmento V8 que incluye una sustitución de codón (subrayada) que codifica Lys 260Gly.

45 La Figura 24 es un análisis por Western blot con un anticuerpo policlonal anti-hu-p40. Los sobrenadantes de células transfectadas con la IL-12p40 de tipo silvestre y variantes de la IL-12p40 (V1-V4), se cosecharon y procesaron en gel SDS-PAGE. Se analizaron dos clones independientes (a, b) de cada variante de IL-12p40, p40V1, p40V2, p40V3, y p40V4. La flecha señala a la banda del fragmento que carece del extremo C-terminal (carril p40 wt) de la IL-12p40 dividida.

50 La Figura 25 muestra el análisis en gel SDS-PAGE para las proteínas de fusión de anticuerpo-IL 12 que contengan las variantes de p40 p40V1, p40V2, p40V3, p40V4, p40V5, p40V6, p40V7, p40V8, y p40 de tipo silvestre (carriles 1-9). La banda principal superior representa la proteína de fusión entre la cadena pesada del anticuerpo y la subunidad p35, y la banda principal inferior representa la cadena liviana del anticuerpo. La banda de 6 kDa no se detectó en ninguno de los carriles de las proteínas variantes, excepto en el carril 5. Los pesos moleculares (kD) están indicados para los marcadores (carril M).

La Figura 26 muestra los datos farmacocinéticos de las proteínas de fusión de anticuerpo-IL 12 que contienen las variantes de p40 p40V1 - p40V8, en comparación con las proteínas de fusión de un anticuerpo -(tipo silvestre)- IL12, administradas por vía intravenosa.

5 La Figura 27A muestra los datos farmacocinéticos de las proteínas de fusión anticuerpo-IL 12 que contienen las variantes de p40 p40V1 - p40V4, en comparación con las proteínas de fusión anticuerpo -(tipo silvestre)- IL12 (panel A), y la Figura 27B muestra los datos farmacocinéticos de las proteínas de fusión anticuerpo-IL 12 que contienen las variantes de p40 p40V5 – p40V8, en comparación con las proteínas de fusión anticuerpo -(tipo silvestre)- IL12 (panel B), administradas por vía subcutánea.

La Figura 28 es una variante de IL-12p40 que presenta mutaciones fuera de la región D3 de la proteína.

10 Descripción detalla de la Invención.

La invención describe las variantes de la subunidad p40 de la citocina interleucina-12 (IL-12) p40 que ha mejorado su estabilidad en comparación con la proteína de tipo silvestre. En estas variantes, una región de la subunidad p40 que es, de manera habitual, no estructurada y sensible al corte proteolítico, es mutada para que sea más resistente al corte proteolítico. Esta región, en el dominio D3, se encuentra cerca del extremo C-terminal de la subunidad p40, abarcando una extensión de polipéptido correspondiente a los aminoácidos 258-266 en p40 humana madura (p40(258-266)).

La subunidad IL-12p40 es además una subunidad componente de la citocina interleucina-23 (IL-23). La IL-23 tiene dos subunidades, la subunidad α "p19" y la subunidad β "p40". La subunidad p40 de la IL-23 es la misma que la IL-12p40. Por lo tanto, las variantes de la subunidad IL-12p40 son, asimismo, variantes de la subunidad IL-23p40.

20 En una clase general de realizaciones, una o más mutaciones son introducidas en la región de p40 que corresponde a los residuos de aminoácidos 258-266 para eliminar el sitio de corte, que en la p40 humana corresponde al sitio entre Lys260 y Arg261. En realizaciones adicionales, se introducen mutaciones específicas en esta región que mediante modelización generan una estructura más firmemente plegada. En otro aspecto de la invención, las mutaciones introducidas de manera adicional se prevén para evitar hacer inmunogénica la región modificada de la subunidad p40. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos en la región modificada de la subunidad p40 se eligen para evitar la creación de péptidos que puedan reconocerse como epítopos de linfocitos T en humanos.

30 Las mutaciones pueden ser introducidas en la región de p40 que corresponde a los residuos de aminoácidos 258-266 mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, en una realización, una mutación o mutaciones se introducen mediante la sustitución de un residuo de aminoácido por otro. En otra realización adicional, una mutación o mutaciones se introducen mediante la delección de uno o más residuos de la subunidad p40. En aún otra realización, una mutación o mutaciones se introducen mediante la inserción de uno o más residuos de aminoácidos en la subunidad p40.

35 En una realización, las variantes de p40 de la invención se encuentran contenidas en composiciones de proteínas tales como las proteínas IL-12, proteínas de fusión de IL-12, proteínas IL-23, proteínas de fusión de IL-23 u homodímeros de p40. Por ejemplo, en una realización, una proteína de IL-12 contiene una subunidad p35 y una variante p40 de acuerdo a la invención. E otra realización, la proteína IL-23 contiene una subunidad p19 y una variante p40 de acuerdo a la invención. En una realización adicional, una proteína de fusión contiene una porción de anticuerpo fusionada a la IL-12 que contiene una variante IL-12p40. En aún otra realización adicional, una proteína de fusión contiene una porción de anticuerpo fusionada a la IL-23 que contiene una variante IL-12p40. En una realización adicional, la porción de anticuerpo de la proteína de fusión es un anticuerpo intacto, una región Fc, una sc-Fv, una porción de un anticuerpo que se une al antígeno, o un fragmento activo de un anticuerpo. En aún otra realización, una proteína de fusión de acuerdo a la invención incluye una variante de IL-12p40 fusionada a una citocina que no sea IL-12 o que no sea IL-23 o una porción activa de la misma.

45 En un aspecto adicional de la invención, las composiciones de proteínas que contienen una de las variantes de p40 de la invención, presentan una vida media en circulación de mayor duración que la correspondiente a la proteína de tipo silvestre. Por tanto, en comparación con las proteínas IL-12 o la IL-23 que contengan la subunidad p40 de tipo silvestre, las variantes de IL-12 o las variantes de IL-23 que incluyan una subunidad p40 modificada de la invención, presentan propiedades mejoradas como agentes terapéuticos con respecto a su producción, formulación y farmacocinética.

50 Las mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la IL-12p40 se introducen fuera de la región IL-12p40(258-266) y de manera opcional fuera del dominio IL-12p40 D3 de la IL-12p40. Tales mutaciones pueden ser introducidas en cualquier otro lugar en el dominio D3 de la IL-12p40, y pueden ser introducidos en los otros dominios. Por ejemplo, la Figura 28 representa una secuencia de una subunidad p40 de IL-12 que presenta modificaciones en la secuencia de aminoácidos fuera de los residuos 258-266. Leong et al., (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 1163-1168,

muestra varios residuos que pueden ser mutados en la secuencia de aminoácidos de IL-12p40 más allá de la región 258-266. Además, debido a que la estructura cristalina en tres dimensiones de la IL-12p40 se conoce (Yoon et al., (2000), EMBO J., 19:3530-3541), y se conocen los residuos esenciales para la interacción de la subunidad p40 con la subunidad p35 de la IL-12, la selección de otras mutaciones que no destruirán la funcionalidad de la subunidad p40 pueden ser determinadas por parte de los expertos en el arte.

Determinación del producto de corte.

La presente invención se basa, en parte, en la observación de que la subunidad IL-12p40 es susceptible a un evento de corte proteolítico específico, y en nuevos resultados experimentales que definen el sitio de corte. Se observó que una proteína IL-12 recombinante purificada, producida en células NS/0, tal como se describe en el Ejemplo 2, mostraban sistemáticamente un grado de heterogeneidad cuando la proteína recombinante se separaba mediante electroforesis en gel SDS-PAGE bajo condiciones de reducción, que puede verse claramente como una banda de proteína adicional de aproximadamente 6 kD de peso molecular. Una observación similar se realizó para la proteína IL-23. Esto se ilustra en la Figura 4 que muestra el análisis en gel SDS-PAGE para varios lotes purificados de las composiciones de proteínas IL-12 humana (Panel A) y la IL-23 humana (Panel B), producidas como proteínas de fusión de un anticuerpo.

El contaminante fue purificado y su secuencia de aminoácidos fue determinada, tal como se describe en el Ejemplo 3, y se encontró que corresponde a la secuencia del fragmento de aminoácidos C-terminal 46 de la propia subunidad IL-12p40, generada mediante el corte proteolítico entre Lys260 y Arg261 (Figura 5 – SEQ ID NO:4). El corte entre Lys 260 y Arg261 parece ser altamente preferente, a pesar de la prevalencia de aminoácidos básicos en la región que rodea el sitio de corte (...KSKREKKDR...(Figura 6 SEQ ID NO:5) donde Lys260 y Arg261 están indicados en negrita). Sin embargo, a pesar de ser separado de la subunidad p40, el fragmento C-terminal de péptido permanece asociado de forma no covalente con el resto de la subunidad p40, dificultando la eliminación de la heterogeneidad resultante mediante purificación adicional de la proteína recombinante.

Proteína IL-12p40.

La subunidad p40 madura humana es una proteína del aminoácido 306 que se asemeja a un receptor de la citocina de clase I soluble, compuesto de los dominios D1, D2 y D3. El sitio de corte (entre Lys260 y Arg261) se encuentra dentro de D3, un dominio III de tipo fibronectina de 96 aminoácidos que abarcan la región desde I211 hasta S306. La secuencia para la subunidad IL-12 p40 humana madura se muestra en la Figura 2. La secuencia de aminoácidos para el D3 se muestra en la Figura 2 en cursiva. En la estructura cristalográfica de rayos X del heterodímero de IL-12 humana publicado (Yoon et al. (2000) EMBO J., 19: 3530-41), no se encuentra resuelta una porción de un lazo dentro de la región de la p40 humana (258-266) del dominio D3. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, las regiones no resueltas en las estructuras cristalinas son a menudo una indicación de lazos flexibles y no estructurados, y pueden constituir sitios diana para la proteólisis.

Un alineamiento de estructura primaria de la subunidad p40 madura de una variedad de especies mamíferas, se muestra en las Figuras 7.1 y 7.2, incluyendo el ser humano; los primates babuino, mono Rhesus y mangabey; perro; gato; caballo; cerdo; los rumiantes vaca, cabra, oveja, ciervo, búfalo de agua; y los roedores hámster, conejillo de Indias, rata algodónera, rata y ratón. En el alineamiento, la región alrededor de p40 (258-266) muestra variabilidad de secuencia, en particular con respecto a su longitud. En particular, en algunas especies, de forma notable en los rumiantes, la secuencia es más corta, y en otras, tales como los roedores, la secuencia en algunos casos puede contener insertos adicionales. En muchas especies, el motivo dipéptido que corresponde a la p40 K260R261 humana es conservado, ya sea de forma idéntica o mostrando dos aminoácidos básicos. Estas especies incluyen especies importantes comercialmente y para la agricultura, incluyendo, pero sin limitarse a, el caballo, la vaca, la cabra, el cerdo y la oveja. En consecuencia, introducir una o más mutaciones en la región de la IL-12p40 no humana, correspondiente a los residuos 258-266 de la IL-12p40 humana, que sean análogas a las mutaciones descritas en la presente memoria con respecto a la IL-12p40 humana, puede resultar de utilidad para la reducción o eliminación del corte proteolítico de la IL-12p40 no humana en el sitio de corte K260R261.

En principio, de acuerdo a la presente invención, es posible utilizar una variante de la IL-12p40 de una especie que carezca de un motivo dipéptido correspondiente a la IL-12p40 K260R261 humana, en un humano o en otro organismo heterólogo. Sin embargo, en la práctica de la invención, es importante destacar que las formas no humanas de la IL-12p40 conducirán, por lo general, a anticuerpos anti-p40 cuando se administran a humanos. En términos más generales, no resulta óptimo administrar p40 de una especie a otra. Además, el potencial de varias subunidades de p40 de ser divididas mediante corte proteolítico es, por lo general, desconocido. Además, las subunidades p40 de una especie pueden no funcionar en otra especie, ya sea bien en el paso de ensamblaje con las subunidades tales como p35 o p19, o bien en el paso de la interacción con las subunidades del receptor.

Proteínas de la variante IL-12p40.

La presente invención proporciona proteínas de la variante IL-12p40 con mutaciones en el dominio D3 que mejoran la estabilidad. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "variante D3" hace referencia al dominio D3 de una subunidad p40 humana, por ejemplo, IL-12 o IL-23, que presenta una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con el D3 de tipo silvestre. El término "variante de p40" se utiliza en la presente patente para hacer referencia a una subunidad de p40 humana de, por ejemplo, IL-12 o IL-23, con mutaciones en el dominio D3, es decir, una subunidad p40 que contiene una variante D3. El término "variante de IL-12" se utiliza en la presente patente para hacer referencia a una proteína IL-12 humana que contiene una variante de p40. El término "variante de IL-23" se utiliza en la presente patente para hacer referencia a una proteína IL-23 humana que contiene una variante de p40.

De acuerdo a la presente invención, el dominio D3 de una variante de p40 tiene, al menos, un 70% o más de identidad de secuencia con el D3 de la IL-12p40 de tipo silvestre. El dominio D3 de una variante de p40 tiene, al menos, un 75% o más de identidad de secuencia con el dominio D3 de la IL-12p40 de tipo silvestre. En aún otra realización, el dominio D3 de una variante de p40 tiene, al menos, un 80% o más de identidad de secuencia con el dominio D3 de la IL-12p40 de tipo silvestre, mientras que en realizaciones adicionales, el dominio D3 de una variante de p40 tiene, al menos, un 81% o más, o al menos un 82% o más, o al menos un 83% o más, o al menos un 84% o más, o al menos un 85% o más, o al menos un 86% o más, o al menos un 87% o más, o al menos un 88% o más, o al menos un 89% o más, o al menos un 90% o más, o al menos un 91% o más, o al menos un 92% o más, o al menos un 93% o más, o al menos un 94% o más, o al menos un 95% o más, o al menos un 96% o más, o al menos un 97% o más, o al menos un 98% o más, o al menos un 99% o más de identidad con el dominio D3 de la IL-12p40 de tipo silvestre.

De acuerdo a la presente invención, la secuencia de aminoácidos de una variante de p40 tiene, al menos, un 70% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la IL-12 p40 madura de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de una variante de p40 tiene, al menos, un 75% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la IL-12p40 madura de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de una variante de p40 tiene, al menos, un 80% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la IL-12p40 madura de tipo silvestre, mientras que, la secuencia de aminoácidos de una variante de p40 tiene, al menos, un 81% o más, o al menos un 82% o más, o al menos un 83% o más, o al menos un 84% o más, o al menos un 85% o más, o al menos un 86% o más, o al menos un 87% o más, o al menos un 88% o más, o al menos un 89% o más, o al menos un 90% o más, o al menos un 91% o más, o al menos un 92% o más, o al menos un 93% o más, o al menos un 94% o más, o al menos un 95% o más, o al menos un 96% o más, o al menos un 97% o más, o al menos un 98% o más, o al menos un 99% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de la IL-12p40 madura de tipo silvestre.

Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se encuentran alineadas con el propósito de una comparación óptima (*por ejemplo*, pueden introducirse huecos en la secuencia para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, el % de identidad = (# de posiciones idénticas/ total # de posiciones) multiplicada por 100). Si las secuencias que están siendo comparadas son de una longitud desigual, la secuencia más corta se utiliza para determinar el número total de posiciones. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede también lograrse utilizando un algoritmo matemático.

Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias, es el algoritmo de Karlin y Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-68, modificado según Karlin y Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-77. Un algoritmo de ese tipo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos mediante BLAST pueden realizarse con el programa BLASTN, puntuación=100, longitud de palabra=12. Las búsquedas de proteínas mediante BLAST pueden realizarse con el programa BLASTX, puntuación=50, longitud de palabra=3. Para obtener alineamientos con huecos, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se encuentra descrito en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Research (Investigación sobre Ácidos Nucléicos), 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN) pueden ser utilizados.

Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que las deleciones tienen el efecto de reducir la flexibilidad conformacional de la región p40(258-266), reduciendo, por tanto, la habilidad del motivo Lys260-Arg261 para adoptar una conformación que permita la división mediante la proteasa relevante. Por lo tanto, en una realización, una o más de Lys263, Lys264, Asp265, se eliminan.

Las sustituciones de aminoácidos se seleccionan de tal manera que eviten la creación de nuevos linfocitos T. Se conocen bien en el arte métodos para analizar secuencias de péptidos por su potencial para crear epítopos de linfocitos T (ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente estadounidense N° 2003/0153043; La

Publicación Internacional N° WO 00/034317; y Stumiolo et al. (1999), Nature Biotech., 17:555-61. En una realización, la secuencia de la IL-12p40(258-266) humana es reemplazada por la secuencia KDENTER (SEQ ID NO:17). En otras palabras, Ser259, Lys260 y Arg261 fueron reemplazados por Asp, Asn, y Thr, respectivamente, mientras que Lys263, Lys264 y Asp265 fueron eliminados, de tal manera que la secuencia resultante del residuo 258-263 en la variante es KDENTER. La variante de IL-12p40 resultante de muestra en la Figura 8.

En otra realización, la secuencia de la IL-12p40(258-266) humana es reemplazada por la secuencia KDNTGR (SEQ ID NO:18). En otras palabras, Ser259, Lys260 y Arg261 fueron reemplazados por Asp, Asn y Thr, respectivamente, mientras que Lys263, Lys264 y Asp265 fueron eliminados y reemplazados por únicamente un residuo Gly, de tal manera que la secuencia resultante del residuo 158-264 en la variante es KDNTGR. La variante de IL-12p40 resultante se muestra en la Figura 9.

En aún otra realización, la secuencia de la IL-12p40(258-266) humana es reemplazada por la secuencia QDQDEKKDR (SEQ ID NO:19). En otras palabras, Lys258, Ser259, Lys260 y Arg261 fueron reemplazados por Gln, Asp, Gln y Asp, respectivamente, de tal manera que la secuencia resultante del residuo 258-266 en la variante es QDQDEKKDR. La variante de IL-12p40 resultante se muestra en la Figura 10.

En una realización adicional, la secuencia de la IL-12p40(258-266) humana es reemplazada por la secuencia QDQDESGDR (SEQ ID NO:20). En otras palabras, Lys258, Ser259, Lys260 y Arg261 fueron reemplazados por Gln, Asp, Gln, Asp, Ser y Gly respectivamente, de tal manera que la secuencia resultante del residuo 258-266 es QDQDESGDR. La variante de IL-12p40 resultante se muestra en la Figura 11.

De acuerdo a la invención, una variante de D3 se encuentra contenida dentro de una subunidad de IL-12p40 o de una porción activa de la misma. Por porciones activas, se entiende que una subunidad de IL-12p40 que contenga una variante de D3 tiene al menos un 10% de actividad, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 50% de actividad, al menos un 70% de actividad, al menos un 75% de actividad, al menos un 80% de actividad, al menos un 90% de actividad, al menos un 95% de actividad, al menos un 99% de actividad, al menos un 100% de actividad, al menos un 150% de actividad, al menos un 200% de actividad, al menos un 300% de actividad, al menos un 400% de actividad, al menos un 500% de actividad, o al menos un 1000% de actividad, en comparación con la actividad biológica de una fracción de la IL-12p40 de tipo silvestre.

Proteínas que contienen variantes de IL-12p40.

Las variantes de la IL-12p40 pueden ser introducidas en composiciones de proteínas en lugar de la IL-12p40 de tipo silvestre. Ejemplos de composiciones de proteínas biológicamente activas que incluyen IL-12p40 son los homodímeros de p40, la IL-12 y las proteínas de fusión de IL-12, y la IL-23 y las proteínas de fusión de IL-23. En un aspecto de la invención, el heterodímero IL-12 p35/ variante de p40 consiste en cadenas de polipéptidos diferentes. De manera alternativa, el heterodímero IL-12 p19/ variante de p40 consiste en una única cadena de polipéptidos. En otro aspecto de la invención, el heterodímero IL-23 p19/ variante de p40 consiste en cadenas de polipéptidos diferentes. De manera alternativa, el heterodímero IL-23 p19/ variante de p40 consiste en una única cadena de polipéptidos.

En otro aspecto de la invención, como parte de una proteína de fusión de IL-12, la compañera de fusión de IL-12 puede ser una fracción de anticuerpo o parte de una fracción de anticuerpo. Como fracciones útiles de anticuerpo se incluyen aquellas que seleccionan como diana de la proteína de fusión de IL-12 el ambiente tumoral, por ejemplo las propias células tumorales, o el núcleo necrótico de un tumor o el estroma de soporte. En otra realización de la invención, la compañera de fusión es otra citocina. Como citocinas útiles se incluyen, pero no se limitan a, la IL-2, IL-7 y la IL-15.

En otro aspecto de la invención, como parte de una proteína de fusión de IL-23, el compañero de fusión de IL-23 puede ser una fracción de anticuerpo o parte de una fracción de anticuerpo. Como fracciones de anticuerpo útiles se incluyen aquellas que seleccionan como diana de la proteína de fusión IL-23 el ambiente tumoral, por ejemplo las propias células tumorales, e el núcleo necrótico de un tumor o el estroma de soporte. En otra realización de la invención, el compañero de fusión es otra citocina. Como citocinas útiles se incluyen, pero no se limitan a, la IL-2, IL-7 y la IL-15.

Ácidos nucleicos que codifican variantes de p40.

En un aspecto adicional de la presente invención, se contemplan los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que contienen las variantes de p40 de la invención. Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de p40 de la invención pueden construirse, por ejemplo, utilizando técnicas de ADN que son familiares para aquellos expertos en el arte. Procedimientos a modo de ejemplo pueden encontrarse en el Ejemplo 1.

La Figura 19 representa la secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad IL-12p40 madura humana. Las Figuras 20-22 representan fragmentos de nucleótidos sintéticos para codificar mutaciones a modo de ejemplo que se encuentran en las variantes de p40 de la invención.

Métodos de Tratamiento Utilizando Variantes de p40.

5 Las variantes de p40 de la invención, incluyendo proteínas de fusión y proteínas IL-12 o proteínas IL-23 que contengan una variante de p40, son útiles como agentes inmunoterapéuticos, tal como por ejemplo para el tratamiento de una amplia variedad de tipos de cáncer, basándose en la demostrada actividad antitumoral de las proteínas IL-12. Por ejemplo, las variantes de p40 de la invención pueden utilizarse, de manera preferente, como un heterodímero con p35, en el tratamiento de varios tipos de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, cáncer renal, 10 cáncer de colon, cáncer de ovario, melanoma y linfoma de linfocitos T, y como un adyuvante para las vacunas contra el cáncer. Las variantes de p40 pueden también ser utilizadas como parte de un homodímero p40/p40 para reducir la respuesta TH 1 (por ejemplo, una respuesta TH 1 asociada a una enfermedad autoinmune).

Administración.

15 Tanto las variantes de IL-12, las variantes de IL-23, como las variantes de p40 de la invención pueden ser incorporadas a una composición farmacéutica adecuada para su administración. Tales composiciones comprenden una variante de IL-12 o una proteína de fusión que contenga una variante de IL-12 y un soporte farmacéuticamente adecuado. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "soporte farmacéuticamente adecuado" está pensado para incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes, y similares, compatibles con su administración farmacéutica. El uso de tales 20 medios o agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en el arte.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con la vía de administración que se tenga la intención de utilizar. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, por vía oral (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (vía tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o 25 subcutánea, pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH puede ser ajustado con 30 ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringas desechables o múltiples viales de dosificación realizados en plástico o cristal.

Los medicamentos que contienen variantes de IL-12, variantes de IL-23 o variantes de p40 de la invención, pueden presentar una concentración de un 0.01 o menos al 100% (w/w), aunque la cantidad varía de acuerdo a la forma de dosificación de los medicamentos.

35 La dosis de administración depende del peso corporal de los pacientes, la seriedad de la enfermedad, el tipo de variante de IL-12p40 en particular que está siendo empleada, y la opinión del doctor. Por ejemplo, para una variante de IL-12 de la invención, es por lo general aconsejable administrar entre aproximadamente 0.01 hasta 10 mg/kg de peso corporal al día, aproximadamente 0.02 hasta aproximadamente 2 mg/kg/día en caso de inyectable, o aproximadamente 0.5 mg/kg/día. La dosis puede ser administrada una vez o varias veces al día, de acuerdo a la 40 gravedad de la enfermedad y a la opinión del doctor. Para una proteína de fusión anticuerpo-IL-12 o una proteína de fusión anticuerpo-IL-12 o proteína de fusión anticuerpo-IL-23 que contengan una variante de IL-12p40 de la invención, resulta aconsejable por lo general administrar entre 0.001 hasta 1 mg/kg de peso corporal por día, aproximadamente 0.002 hasta 0.5 mg/kg/día en caso de inyectable, o aproximadamente 0.1 mg/kg/día. La dosis puede ser administrada una o dos veces por un periodo de 2, 3 ó 4 semanas, de acuerdo a la naturaleza y gravedad 45 de la enfermedad o a la opinión del doctor.

Aspectos de la invención se ilustran con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos.

Ejemplo 1: Clonación de variantes de las subunidades de IL-12p40 humana.

50 Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de p40 de la invención, en particular, p40V1 a p40V8 (SEQ ID NO:6-13), se construyeron utilizando técnicas de ADN estándar, familiares para aquellos expertos en el arte. En esencia, un casete de ADN, que codifica un fragmento, que se extiende sobre la región que abarca los residuos de aminoácidos mutados y que se encuentra encuadrada por convenientes sitios de restricción, se sintetizó de novo (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA), y fue sustituido por el correspondiente fragmento de secuencia de tipo

silvestre contenido en un plásmido de expresión que lleva la secuencia de p40 (ver, por ejemplo, pNC-p40 en la Patente estadounidense N° 6,838,260). La secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad IL-12p40 madura humana (de tipo silvestre), se muestra en la Figura 19. Los plásmidos de expresión que codifican las variantes de p40 fueron, de ese modo, obtenidos.

5 En particular, los ácidos nucleicos que codifican la p40V1 y p40V2 se generaron como sigue a continuación. Un vector de clonación portador de los casetes de ADN de p40V1 y p40V2 (pBHV1V2), sintetizado como un fragmento contiguo tal como se muestra en la Figura 20, fue digerido con Bpu10 I y o bien Eco RI / Sca I o bien Bbs I, generando un casete EcoR I / Bpu 10 I (para V1) y Bbs I / Bpu10 I (para V2) con extremos compatibles EcoR I / Bpu10 I, respectivamente. La digestión de Sca I sue incluida para eliminar el fragmento V2 de similar tamaño. Estos fragmentos purificados fueron clonados en un vector de expresión en un triple ligamiento con los fragmentos apropiados de Bpu10 I / Pvu I y Pvu I / Eco RI obtenidos de NC-p40.

Un enfoque idéntico fue utilizado para generar ácidos nucleicos que codifican p40V5 y p40V6, comenzando con la secuencia sintetizada mostrada en la Figura 21, y para generar ácidos nucleicos que codifican p40V7 y p40V8, comenzando con la secuencia sintetizada mostrada en la Figura 23.

15 De manera similar, para generar ácidos nucleicos que codifiquen p40V3 y p40V4, el plásmido (pBHV3V4) portador de la secuencia sintetizada mostrada en la Figura 22, fue digerido con EcoR I / Bbs I/Sca I (la digestión de Sca I fue incluida para eliminar el fragmento V4 de tamaño similar), o con Bbs I únicamente, generando un casete EcoR I / Bbs I (para V3) y un casete Bbs I (para V4), respectivamente, cada uno con extremos compatibles con el plásmido de expresión pNC-p40 digerido con EcoR I / Bbs I. Hay que señalar que para la enzima de restricción Bbs I las secuencias de reconocimiento y de corte están separadas, y de este modo las secuencias que contienen múltiples sitios de reconocimiento Bbs I pueden generar extremos salientes de secuencia específica y diferentes. Los casetes V3 y V4 fueron entonces purificados en gel y ligados, respectivamente, en el plásmido de expresión pNC-p40 en un ligamiento triple utilizando los fragmentos apropiados de Bbs I / Pvu I y Pvu I / Eco RI obtenidos de pNC-p40.

El mismo enfoque general puede ser utilizado para generar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican otras variantes de p40 contempladas por la presente invención.

Ejemplo 2: Expresión de variantes de p40 y de proteínas de fusión anticuerpo-IL 12 que contienen variantes de p40.

Se utilizaron métodos estándar para generar líneas celulares que expresan variantes de p40 de la invención (ver la Patente estadounidense N° 6,838,260). Los plásmidos de expresión pNC-p40 que codifican variantes de p40 fueron introducidos en células, por ejemplo, células NS/0. Las células se colocaron en placas, y se seleccionaron células transfectadas en un medio que contiene G418. Sobrenadantes de cultivo de clones resistentes a fármacos fueron analizados para la producción de p40 mediante ELISA, y los mayores productores fueron subclonados y probados para una expresión estable.

Para generar proteína de fusión anticuerpo-IL-12 que exprese líneas celulares con variantes de p40 de la invención, se siguió el enfoque de transfección secuencial descrito en la Patente estadounidense N° 6,383,360. Por ejemplo, la proteína de fusión DI-NHSIL12p40V1 se obtuvo mediante transfección adicional de la línea celular que expresa p40V1 con un segundo plásmido, pdHL10lambdaDINHSp35, que codifica el anticuerpo NHS76, en donde el C-terminal de la región constante de la cadena pesada se encuentra conectado al N-terminal de la subunidad de IL-12 p35. El plásmido de expresión pdHL10lambda es un derivado de pdHL7, en donde el dominio constante de la cadena liviana codificado es una cadena lambda. Las células fueron seleccionadas en un medio que contiene metotrexato, y se clonaron transfectantes estables que expresan las proteínas de fusión de un anticuerpo mediante métodos estándar.

Ejemplo 3: Purificación y caracterización de las variantes de p40.

Para caracterizar la integridad de las variantes de p40 p40V1, p40V2, p40V3, y p40V4 (SEQ ID NO:6-9), se recogieron medios de cultivo de células agotados de células NS-0 transfectadas de forma transitoria que expresan estas variantes, y se procesaron para un Western blot con un anticuerpo anti-hu-p40 policlonal, que se muestra en la Figura 24. La subunidad p40 de tipo silvestre de control fue incluida a modo de control (carril 1). Se encontró que las especies separadas que carecen del fragmento C-terminal de 6 kDa, que es de manera habitual bien resuelto a partir de las especies de p40 intactas mediante estas condiciones electroforéticas (ver la flecha señalando a la banda en el carril 1), no se encontraba presente en ninguna de las variantes probadas (carriles 2-9), y solo pudo detectarse p40 intacto. De este modo, las variantes de p40 probadas fueron resistentes a una actividad proteolítica durante la expresión de la proteína.

Las proteínas de fusión de un anticuerpo que contiene variantes de IL-12p40 fueron purificadas del sobrenadante del cultivo celular utilizando técnicas estándar basadas en la captura de la Proteína A (ver la Patente estadounidense N° 6,838,260).

5 El SDS-PAGE en gel de las proteínas de fusión de un anticuerpo de clones estables de NS-0 de las variantes de p40, dadas en SEQ ID NOS:6-13 (carriles 1-8) y del control sin mutaciones (carril 9), se muestra en la Figura 25. El centro de las tres bandas mayores representa la subunidad p40 no separada, con la banda borrosa ligeramente por encima indicando especies más glicosiladas. La banda principal superior representa la proteína de fusión entre la cadena pesada del anticuerpo y la subunidad p35, y la banda principal inferior representa la cadena liviana del anticuerpo. Se encontró que, con la excepción del ejemplo de la proteína de fusión de un anticuerpo que contiene IL-12p40V5, la banda de 6 kDa no se encontraba presente. Para la IL-12p40V5, se observó una banda de 6 kDa residual (carril 5).

Ejemplo 4: Caracterización de un sitio de corte proteolítico en la subunidad IL-12p40 de tipo silvestre.

15 La identidad del fragmento de proteína contaminante, de 6 kDa aproximadamente, se determinó mediante métodos estándar. Brevemente, se desnaturalizó la proteína DI-NHS-IL12 purificada y se redujo en una solución en tampón de 6 M guanidina / 1 mM DTT a 55 °C, fue sometida a separación por Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés) de fase reversa sobre una columna Vydac C4 con un 10% a un 90% de gradiente de acetonitrilo. Se recogió la fracción que corresponde a la especie de péptido no identificada, se secó y se colocó nuevamente en suspensión para someterla a SDS-PAGE en gel, confirmando que correspondía al fragmento de 6 kDa, y para determinar la secuencia del péptido mediante la secuenciación del N-terminal. El análisis de secuenciación reveló un péptido con la secuencia REKKDRVFTD, que corresponde a una secuencia en la subunidad IL-12p40 madura humana (de tipo silvestre) que comienza en Arg261.

Ejemplo 5: Bioactividad de las proteínas IL-12 que contienen variantes de p40.

25 La bioactividad de las proteínas IL-12 que contienen variantes de p40 fue medida por inducción del IFN- γ de PBMC (Célula mononuclear de sangre periférica) humana. Las proteínas de fusión de un anticuerpo Ab-IL-12 que contienen variantes de p40V1 a p40V8 se compararon con Ab-IL-12 con p40 de tipo silvestre y una proteína IL-12 humana recombinante.

30 El ensayo de inducción del IFN- γ fue realizado esencialmente tal como se describe en Gately et al. (1995), Current Protocols in Immunology (Protocolos Actuales en Inmunología), Sección 6.16.4, y en Kobayashi et al. (1989), J. Exp Med., 170: 827-845. Las PBMC fueron cultivadas con PHA-P durante 3 días y entonces se añadió 25 IU/ml de hu IL-2 (R&D Systems, Minneapolis MN) durante un periodo adicional de 24 horas. Las células se lavaron, se añadió 20 IU/ml de IL-2 a todas las células, seguido de la adición de las proteínas de fusión de IL-12, con una serie de dilución doble comenzando en 20 ng/ml (en cuanto a la contribución de masa relativa de la IL-12 a la molécula). Veinticuatro horas más tarde, la concentración de IFN- γ se midió mediante ELISA utilizando parejas de anticuerpos adquiridos de R&D Systems.

35 Los resultados de dos experimentos diferentes utilizando las PBMC de diferentes donantes se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Bioactividad de variantes de Ab-IL12 en un ensayo de inducción de IFN- γ .

Proteína	Inducción de IFN- γ ED50 (ng/ml)	
	AVG (n=3)	SD
Ejemplo I		
R&D IL-12	0.04	0.02
Ab-IL12	0.43	0.21
Ab-IL12 V1	1.11	0.59
Ab-IL12 V2	1.09	0.32
Ab-IL12 V3	1.09	0.21
Ab-IL12 V4	1.44	0.48

Tabla 1 (cont)

Proteína	Inducción de IFN- γ ED50 (ng/ml)	
Ejemplo II		
R&D IL-12	0.05	0.03
Ab-IL12	0.53	0.42
Ab-IL12 V1	1.53	0.58
Ab-IL12 V4	1.79*	0.80
Ab-IL12 V5	0.58	0.39
Ab-IL12 V6	1.63	1.46
Ab-IL12 V7	0.99	1.27
Ab-IL12 V8	0.74	0.68
*(n=2)		

5 En comparación con la IL-12 hu recombinante, la actividad de Ab-IL12 con p40 de tipo silvestre fue reducida en aproximadamente 10 veces. Se encontró que las proteínas anticuerpo-variante de IL-12 probadas no afectaron de forma significativa la actividad de la proteína. Ab-IL12p40V1 a Ab-IL12p40V8 habían reducido la actividad en cierta manera (aproximadamente 1.5-3 veces menos) en comparación a la proteína de fusión anticuerpo-IL-12 de tipo silvestre correspondiente.

10 **Ejemplo 6: Farmacocinética de las proteínas IL-12 que contienen variantes de p40.**

Se determinó la farmacocinética de las proteínas de fusión de un anticuerpo que contienen las variantes de p40. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándar familiares para aquellos expertos en el arte. Brevemente, se inyectaron ratones BALB/c (n=3 por grupo de tratamiento) con 25 μ g de Ab-IL12 o variantes de Ab-IL12 que contienen las variantes p40V1, p40V2, p40V3, p40V4, p40V5, p40V6, p40V7 y p40V8, en un volumen de 0.2 ml, bien por vía intravenosa en la vena de la cola o por vía subcutánea. En varios puntos de tiempo hasta 24 horas y hasta 96 horas, respectivamente, se tomaron pequeños volúmenes de sangre mediante sangrado retro-orbital, y se recogieron en probetas revestidas de heparina para evitar la coagulación. Después de la centrifugación para eliminar células, el plasma se analizó mediante captura con antisueros de IgG H&L anti-humano y detección con un anticuerpo de IL-12 anti-humano. Los resultados se normalizaron a la concentración inicial en el plasma de cada ratón tomados dentro de los 30 segundos siguientes tras la inyección (t=0). La Figura 26 es una compilación de experimentos representativos que evalúan la farmacocinética de la proteína administrada por vía intravenosa. Se encontró que en comparación a la proteína de control de tipo silvestre, las proteínas de fusión anticuerpo-IL-12 que contienen las variantes p40V1 y p40V2, p40V3, p40V4, además de p40V6, habían mejorado de forma significativa los valores farmacocinéticos. En particular, se encontró que la vida media de la fase de distribución (fase alfa) se doblaba aproximadamente, y en consecuencia el AUC de las proteínas variantes se doblaba, aproximadamente, también. Sin embargo, la fase de eliminación (fase beta) de todas las proteínas de fusión Ab-IL-12 permaneció básicamente similar. Estos resultados fueron consistentes con la farmacocinética de estas proteínas cuando se administraban al ratón por vía subcutánea. La Figura 27, panel A, muestra una comparación de Ab-IL12 de tipo silvestre con variantes de Ab-IL12 que contienen p40 V1, p40 V2, p40 V3, y p40 V4, y el panel B muestra una comparación de Ab-IL12 de tipo silvestre con variantes de Ab-IL12 que contienen p40 V5, p40 V6, p40 V7, y p40 V8.

30 **Ejemplo 7. Tratamiento de un paciente humano con variantes de la IL-12p40.**

Las variantes de IL-12p40 de la presente invención se utilizan para evitar y tratar enfermedades y trastornos humanos de la siguiente forma. En general, el método preferente de administración es mediante infusión intravenosa o inyección intravenosa, o mediante inyección por vía subcutánea, inhalación, aunque la administración oral, y otros métodos son también posibles.

- 5 Un paciente con un cáncer de próstata metastásico avanzado, con una historia de tratamiento con quimioterapia convencional, se trata como sigue a continuación con una proteína de fusión anticuerpo-IL23 que contiene una variante de IL-12p40. La dosis de la proteína de fusión anticuerpo-IL12 por ciclo de tratamiento es de aproximadamente 150 microgramos por kg de peso corporal, y puede ser administrada en un solo día o en dos o tres días adyacentes, con administración mediante infusión por goteo. El tratamiento puede ser combinado con tratamiento de cuidado estándar para el cáncer de próstata, según se determina por parte de un médico como apropiado para el paciente. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo Naproxeno™. Los ciclos de tratamiento se repiten aproximadamente una vez cada tres semanas.
- 10 Un paciente con cáncer de mama refractario a hormonas se trata mediante infusión por goteo con una proteína de fusión anticuerpo-IL12 que contiene una variante de IL-12p40. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo Naproxeno™.
- 15 En una estrategia alternativa de tratamiento, un paciente con cáncer de próstata refractario a hormonas avanzado o un cáncer de mama refractario a hormonas avanzado, se trata con una proteína de fusión anticuerpo-IL12 que contiene una variante de p40 aproximadamente una vez cada tres semanas, en combinación con una IL-2 que contiene una inmunocitocina tal como la KS-IL2. Estos dos agentes pueden ser administrados conjuntamente mediante infusión por goteo. Previamente al tratamiento, se administra al paciente una dosis de una cantidad inmunoestimulante de ciclofosfamida. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo Naproxeno™.
- 20 Un paciente con artritis reumatoide se trata con una proteína de fusión Fc-p40, en la que la subunidad p40 es una variante de 12p40, aproximadamente una vez cada dos semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo. Se ha encontrado que la progresión de la destrucción de las articulaciones se ha inhibido de forma significativa mediante monoterapia, incluso en comparación con los fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Una variante de la IL-12p40 que comprende una sustitución o delección de un aminoácido en una o más posiciones, correspondientes a las posiciones 258-266 de la IL-12 p40 humana madura parental, en donde la variante comprende sustituciones en las posiciones Lys260, Ser259 y Arg261.
- 5 2. Una variante de la reivindicación 1, que comprende las sustituciones Ser259Asp, Lys260Asn, y Arg261 Thr.
3. Una variante de la reivindicación 2, que además comprende la sustitución Lys264Gly.
4. Una variante de la reivindicación 3, en donde además uno o ambos de los residuos Lys263 y Asp265 son eliminados.
- 10 5. Una variante de la reivindicación 1 ó 2, en donde uno o más residuos correspondientes a Lys263, Lys264, Asp 265, y Arg266 son eliminados.
6. Una variante de la reivindicación 1 ó 2, que además comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Lys263, Lys264, Asp 265, y Arg266, en donde el correspondiente residuo de aminoácido original es reemplazado por un aminoácido no básico.
7. Una variante de la reivindicación 1, que comprende
 - 15 (i) las siguientes sustituciones: Ser259Asp, Lys260Asn, y Arg261Thr, y
 - (ii) las siguientes delecciones: Lys263, Lys264 y Asp265,
 - en donde dichas posiciones están relacionadas con la molécula modificada de tipo silvestre,
 - formando de ese modo la formación de secuencia Lys - Asp - Asn - Thr - Glu – Arg en las posiciones 258 – 263 de la variante.
- 20 8. Una variante de la reivindicación 1, que comprende
 - (i) las siguientes sustituciones: Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr, y Lys264Gly, y
 - (ii) las siguientes delecciones: Lys263 y Asp265,
 - en donde dichas posiciones están relacionadas con la molécula modificada de tipo silvestre,
 - formando de ese modo la formación de secuencia: Lys - Asp - Asn - Thr - Glu - Gly – Arg en las posiciones
 - 25 258-264 de la variante.
9. Una variante de la reivindicación 1, que comprende las siguientes sustituciones:

Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp,

formando de ese modo la formación de secuencia: Gln - Asp - Gln - Asp - Glu - Lys - Lys – Arg en las posiciones 258-265 de la variante.
- 30 10. Una variante de la reivindicación 1, que comprende las siguientes sustituciones:

Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp, Lys263Ser, Lys264Gly,

formando de ese modo la formación de secuencia: Gln - Asp - Gln - Asp - Glu - Ser- Gly – Arg en las posiciones 258 – 265 de la variante.
- 35 11. Una proteína IL-12 o un fragmento de la misma que contiene la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10.
12. Una proteína IL-23 o un fragmento de la misma que contiene la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 13-

13. Una proteína de fusión que comprende una variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, o una proteína de la reivindicación 11 ó 12, y un anticuerpo o una porción activa del mismo.
14. Una proteína de fusión de la reivindicación 13, en donde dicha variante o dicha proteína se fusiona al C-terminal de dicho anticuerpo o porción de anticuerpo.
- 5 15. Un ácido nucleico que codifica una variante de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 – 10, o una proteína de las reivindicaciones 11 ó 12, o una proteína de fusión de la reivindicación 13 ó 14.
16. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.
- 10 17. Una célula hospedadora que produce una variante de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, o una proteína de la reivindicación 11 ó 12, o una proteína de fusión de la reivindicación 13 ó 14, que comprende el vector de expresión de la reivindicación 16.
18. Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad farmacológicamente efectiva una proteína o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 11 – 14, de manera opcional junto con un diluyente o excipiente portador aceptable farmacéuticamente.
- 15 19. Una composición farmacéutica de la reivindicación 18 para su uso para el tratamiento del cáncer o de una enfermedad autoinmune.

Figura 1

RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE
DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL
CLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF
NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
(SEQ ID NO:1)

Figura 2

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEW
ASVPCS (SEQ ID NO:2)

Figura 3

AVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPH
IQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLPDSP
VGQLHASLLGLSOLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLO
AFVAVAAARVFAHGAATLSP
(SEQ ID NO:3)



A

Figura 4A

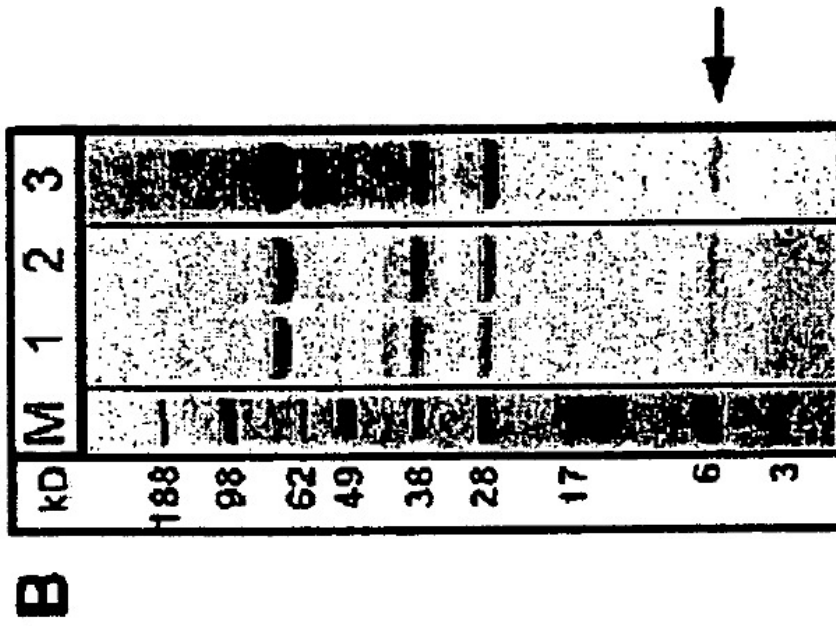


Figura 4B

Figura 5

REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
(SEQ ID NO:4)

Figura 6

KSKREKKDR
(SEQ ID NO:5)

Figura 7.1

1	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWFLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF	p40	humano
1G.....	p40	babuino
1G.....	p40	rhesus
1G.....	p40	mangabey
1	...E...H...H...D...SA.....	p40	perro
1	...E.N...H...D...S.....	p40	gato
1	...E...N...E...SA.N.....	p40	caballo
1	...E.N...N...N...S...T...H...	p40	cerdo
1	M...E.N...T...S.....	p40	vaca
1	...E.N.I...T...S.....	p40	búfalo de agua
1	...E.N...N...T...S.....	p40	cabra
1	...E.N...N...T...S.....	p40	oveja
1	...E.N...T...R...S...V.....	p40	ciervo
1	...E...V...A...R...S...D.I...S.KN...AV.....	p40	hámster
1	M...E...HT...T...N.A...S.RK.DI.....	p40	conejillo de Indias
1	...E...V.S.G...R...S...D.I...S...V...IV.....	p40	rata algodonera
1	M...E...V.R...T.T...S...D...S...RRG.I...T.R.....	p40	rata
1	M...E...V.T...T.N...D...S...RHG.I...T.....	p40	ratón
61	GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDLKDQKEPKNKTPLRCEAKNYSGRFTC	p40	humano
61A.....V.....	p40	babuino
61A.....V.....	p40	rhesus
61A.....P.....E.....I.....	p40	mangabey
61K...R...I...E...S...I...K.....	p40	perro
61	A.....F...I...RE...S...I...K.....	p40	gato
61	...W...H...S...K.....	p40	caballo
61R...A...Q.....S...K.....	p40	cerdo
61A...R.....A.S...K...D...H...	p40	vaca
61A...R.....A.S...K...D...H...	p40	búfalo de agua
61R.....A.S...K...D...H...	p40	cabra
61R.....A.S...K...D...H...	p40	oveja
61R.....A.S...K...D...H...	p40	ciervo
61	SN.....KT...R...N...D...K...A.....	p40	hámster
61	E...G...R...Q...E...E...GSNG...K...RS.....	p40	conejillo de Indias
61	S...T...R...D...K...A.....	p40	rata algodonera
61	L...R...T...H...N...E...N--F...K...P.....	p40	rata
61	L...T...H...N...E...N--F...K...P.....	p40	ratón
121	WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPOGVTCGAATLSAERVGRDNKEY-EYSVECQEDSACPA	p40	humano
121N.....V.....	p40	babuino
121N.....V.....	p40	rhesus
121	...S...II...N.....	p40	mangabey
121	...A...K...F...V...V...RD.KK.T...G...S	p40	perro
121	...A...K.T...K...V...RD.KK.T...G...	p40	gato
121	...A...K...R...SV.DR.KK.T...G...	p40	caballo
121	...A...K...T...R...T...EDLG...KK.R...G...	p40	cerdo
121	...A...K...R...L...K.SLEHR.NK.T...G...	p40	vaca
121	...A...K...A...R...S...K.SV.HR.NK.T...G.T...	p40	búfalo de agua
121	S...A...NK...R...S...K.SM.HR.NK.T...G...	p40	cabra
121	S...A...NK...R...S...K.SM.HR.NK.T...G...	p40	oveja
121	...A...K...R...S...T.K.IV.HR.KK.T...G...	p40	ciervo
121	...A...K.N...SS...SRA...S...K.TV.R.D.QK...A...IT.T	p40	hámster
121	...APG.VK...G...S...E...S...Q...K...T	p40	conejillo de Indias
121	...AV...K.L...SS...SRS...S...T.K.TV.QRD.NK...A...IT.T	p40	rata algodonera
118	S...VHRN...K.NI...SS.PESRA...R.S...K.TLNQRD.EK...A...VT.T	p40	rata
118	S...VQRNM...K.NI...SS.P.SRA...M.S...K.TL.QRD.EK...S...VT.T	p40	ratón

Figura 7.2

180	AEE S LPIE V MD V A H K L K Y EN Y T S S F F I R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P D T	p40	humano
180	...R...I...A...	p40	babuino
180	...R...I...	p40	rhesus
180	...R...I...	p40	mangabey
181	...V...I...T...H...	p40	perro
181	...V...I...H...	p40	gato
181	...IV...G...E...	p40	caballo
176	...VLE...N...H...I...	p40	cerdo
181	...L...V...E...R...	p40	vaca
181	...L...V...E...	p40	búfalo de agua
181	...VME...R...	p40	cabra
181	...VME...R...	p40	oveja
181	...V...E...R...	p40	ciervo
181	...T...GLVME.Q.Y...STG...RG...M.L...S	p40	hámster
176	...V...I...F...Y...SV...Q...	p40	conejillo de Indias
181	...T...LVME.Q.Y...STG...S...	p40	rata algodonera
178	...T...LV.E.QQON...ST...V...	p40	rata
178	...T...LAL.E.RQQN...ST...M...	p40	ratón
240	W S T P H S Y F S L T F C V Q V Q G --K S K R E K K D R-----V F -T D K T S A T V I C R K N A S I S V R	p40	humano
240	...I...I...F..Q	p40	babuino
240	...I...I...F..Q	p40	rhesus
240	...I...I...F..Q	p40	mangabey
241	...A...--NN...--LC-V...K.V.H.D.K.R.Q	p40	perro
241	...G...--NN...--LS-V...K.V.H.D.K.R.Q	p40	gato
241	...SI...--N.K.R...--L-M.E...T.H.DGQ.R.Q	p40	caballo
236	...M.G...--N...K...--L...QI...K.T.H.D.N.R.Q	p40	cerdo
241	...N...--L-M.Q...K.T.H.D.NVR.Q	p40	vaca
241	...N...--L-M.Q...K.T.H.D.NVR.Q	p40	búfalo de agua
241	...N...--L...Q...K.T.H.D.N.R.Q	p40	cabra
241	...N...--L-A.Q...K.T.H.D.N.R.Q	p40	oveja
241	...N...--L-M.Q...K.T.H.D...R.Q	p40	ciervo
240	...K.H...HR...R...ES...--Q-V...IR.S.G.EVR..	p40	hámster
236	...L...TH.KN.NR...YE...--L...S.H.ISKVE..	p40	conejillo de Indias
240	...K.P...YR...--K...GES...--LLV...P...KIR.S.GGEVR..	p40	rata algodonera
237	...K.P.R.I.R...--K...TKETE E ECN Q KGA.LVE...E.Q...G.N.C.Q	p40	rata
237	...K.P.R.I.R...--K...MKETE E EGCN Q KGA.LVE...TE.Q...GGNVC.Q	p40	ratón
292	AQDRYYSSSWSEWASVPCS	p40	humano (SEQ ID NO:2)
292	p40	babuino (SEQ ID NO:27)
292	p40	rhesus (SEQ ID NO:28)
292	...N...T...	p40	mangabey (SEQ ID NO:29)
293	...R...D...S..	p40	perro (SEQ ID NO:30)
293	...R...N...S..	p40	gato (SEQ ID NO:31)
293	...R...S...S..	p40	caballo (SEQ ID NO:32)
288	...R...S...N	p40	cerdo(SEQ ID NO:33)
291	...R...F...S..	p40	vaca (SEQ ID NO:34)
291	...R...F...S..	p40	búfalo de agua (SEQ ID NO:35)
291	...R...F...S..	p40	cabra (SEQ ID NO:36)
291	...R...P...S..	p40	oveja (SEQ ID NO:37)
291	...R...N.P...S..	p40	ciervo (SEQ ID NO:38)
291	...H...N...R.V...	p40	hámster (SEQ ID NO:39)
290	...R...S...EVSVSR	p40	conejillo de Indias(SEQ ID NO:40)
291	...H...N...S...N	p40	rata algodonera (SEQ ID NO:41)
296	...N...C.K.TC...RGRS	p40	rata (SEQ ID NO:42)
296	...N...C.K...C...RVRS	p40	ratón (SEQ ID NO:43)

Figura 8

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKDNTERVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASV
PCS

(SEQ ID NO:6)

Figura 9

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKDNTEGRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS
VPCS

(SEQ ID NO:7)

Figura 10

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGQDQDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:8)

Figura 11

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGQDQDESGDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:9)

Figura 12

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSKAEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:10)

Figura 13

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSAAEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:11)

Figura 14

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSAREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO: 12)

Figura 15

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSGREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO: 13)

Figura 16

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:14)

Figura 17

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSKDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:15)

Figura 18

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSQDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

(SEQ ID NO:16)

Figura 19

ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGG
 CCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTGCTAGAAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGG
 AGAAATGGTGGTCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAG
 AGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAACCCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTG
 GCCAGTACACCTGTCAAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCCTGCTGCTTACAAAAA
 GGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTT
 CTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTA
 CTGATTTGACATTAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCAAGGGGTGACGTGCGG
 AGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAAGAGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAG
 TGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTCATGGTGGATG
 CCGTTACAAGCTCAAGTATGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACC
 TGACCCACCAAGAAGCTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGG
 GAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCC
 AGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCAT
 CTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGC
 GAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTAG

(SEQ ID NO:21)

Figura 20

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCTAC
 TTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGGACAATACGGAGAGAGTGTTACCGGACA
 AGACCTCAGCttttttttttttttgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTA
 CCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGC
AAGGACAATACGGAGGGTAGAGTGTTACGGACAAGACCTCAGC

(SEQ ID NO:22)

Figura 21

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCTAC
 TTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCCAGGATCAGGACGAGAAGAAGGATAGAGTCT
 TCTTTTTTTTTTgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTG
 GAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCCAGGATCAGGAC
GAGTCCGGAGATAGAGTCTTC

(SEQ ID NO:23)

Figura 22

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCTAC
 TTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGGCAGAAAAGAAAGATAGAGTCT
 TCACGGACAAGACCTCAGCttttttttttttgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTTG
 GGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCC
CAGGGCAAGAGCGCAGCTGAAAAGAAAGATAGAGTCTTTACGGACAAGACCTCAGC

(SEQ ID NO:24)

Figura 23

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCTAC
TTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCGCCCGGGAAAAGAAAGATAGAGTCT
TCACGGACAAGACCTCAGCtttttttttttgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTTG
GGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTC
CAGGGCAAGAGCGGTAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTTACGGACAAGACCTCAGC
(SEQ ID NO:25)

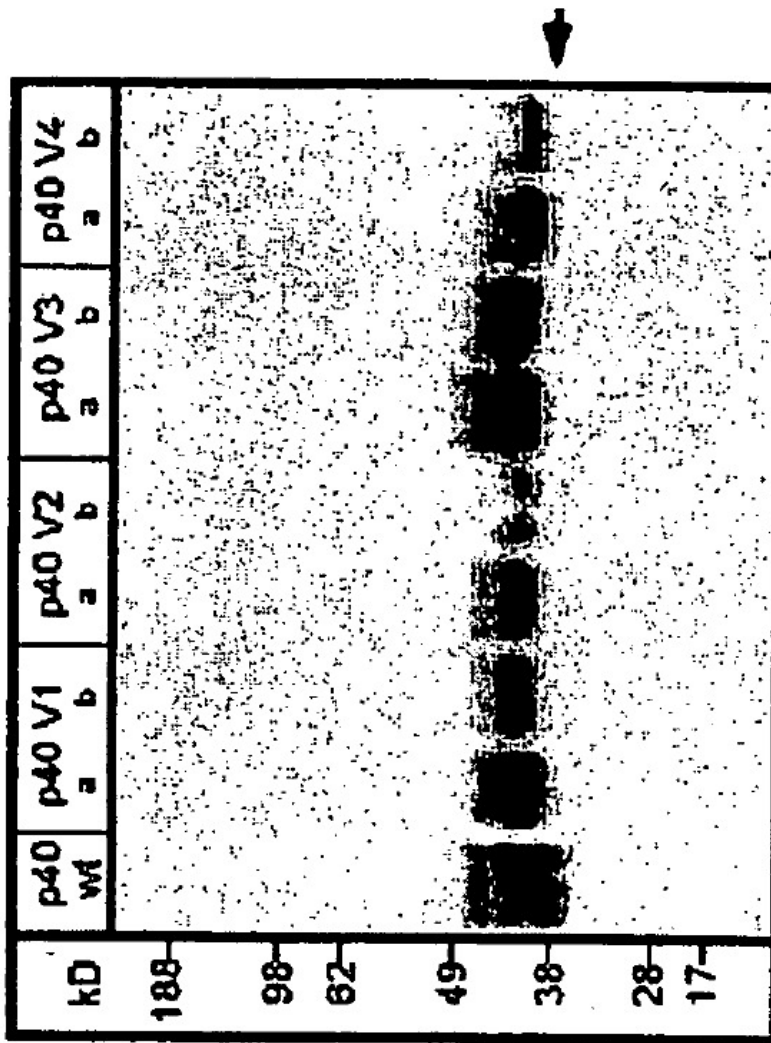


Figura 24

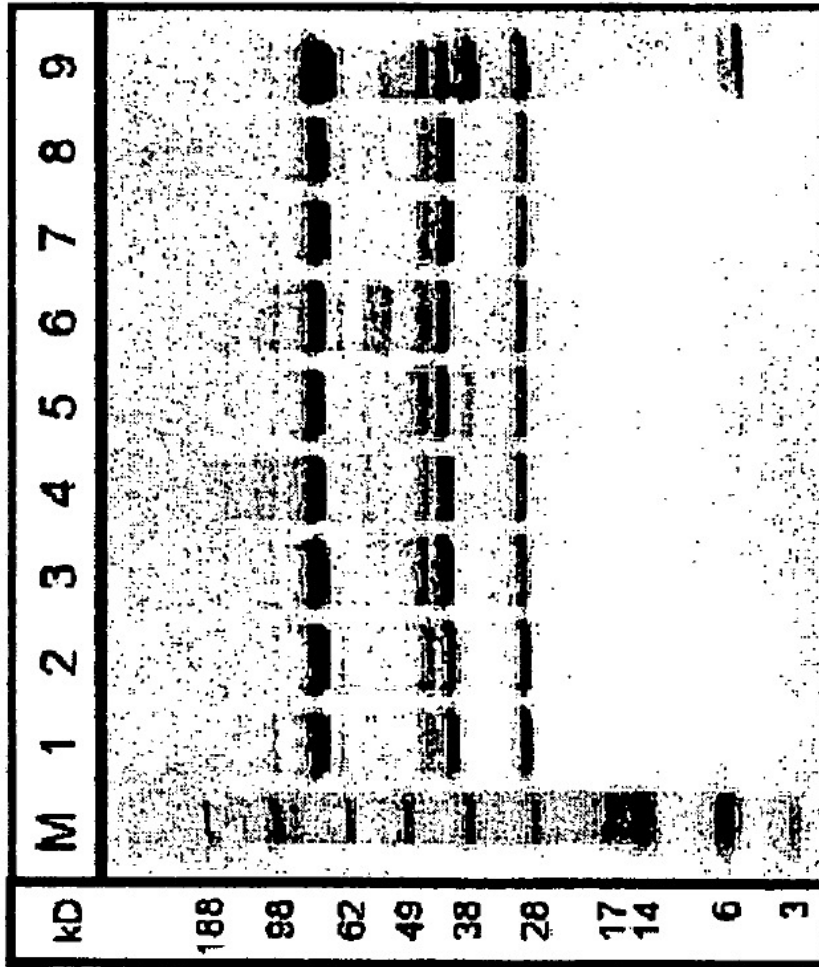


Figura 25

PK de las variantes de Ab-IL12 (i.v.)

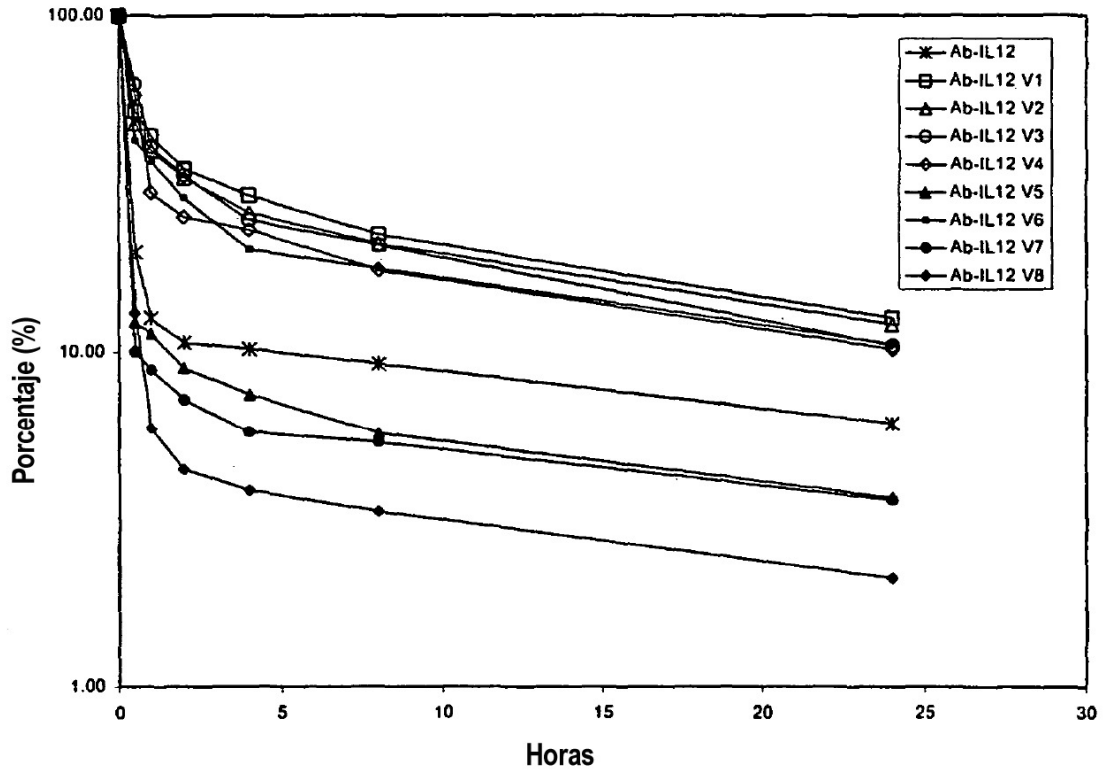


Figura 26

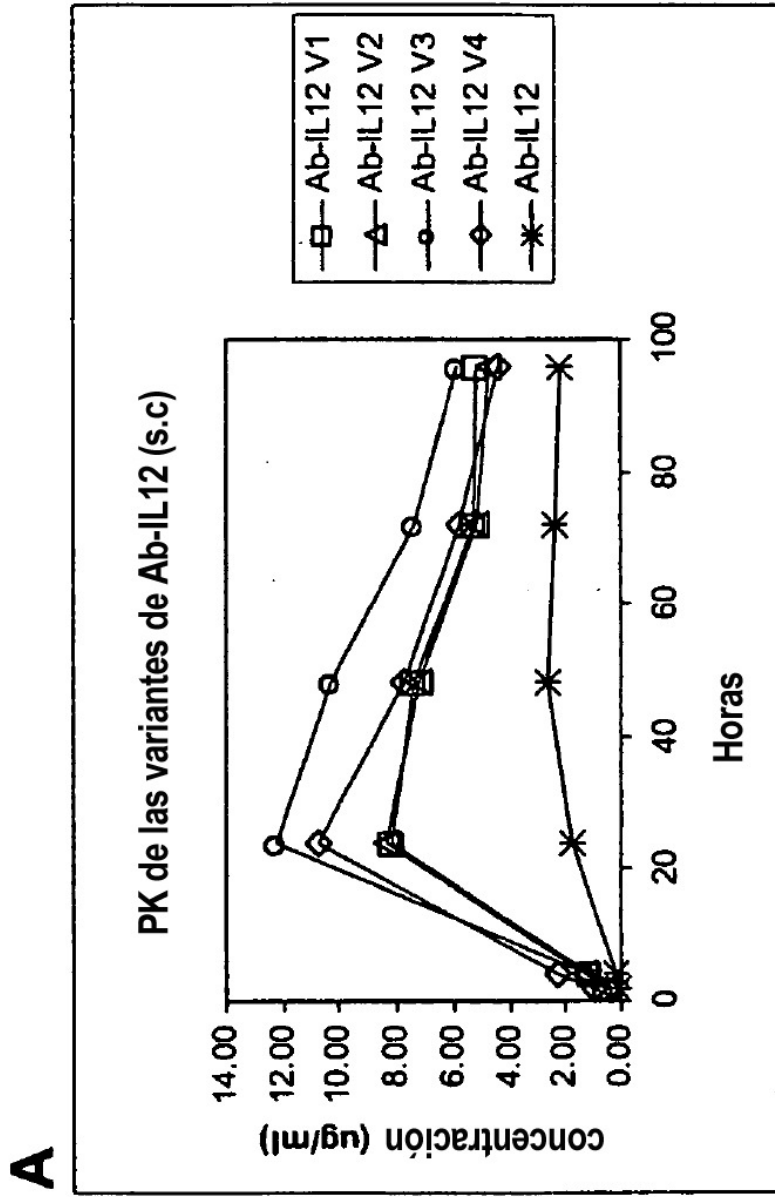


Figura 27 A

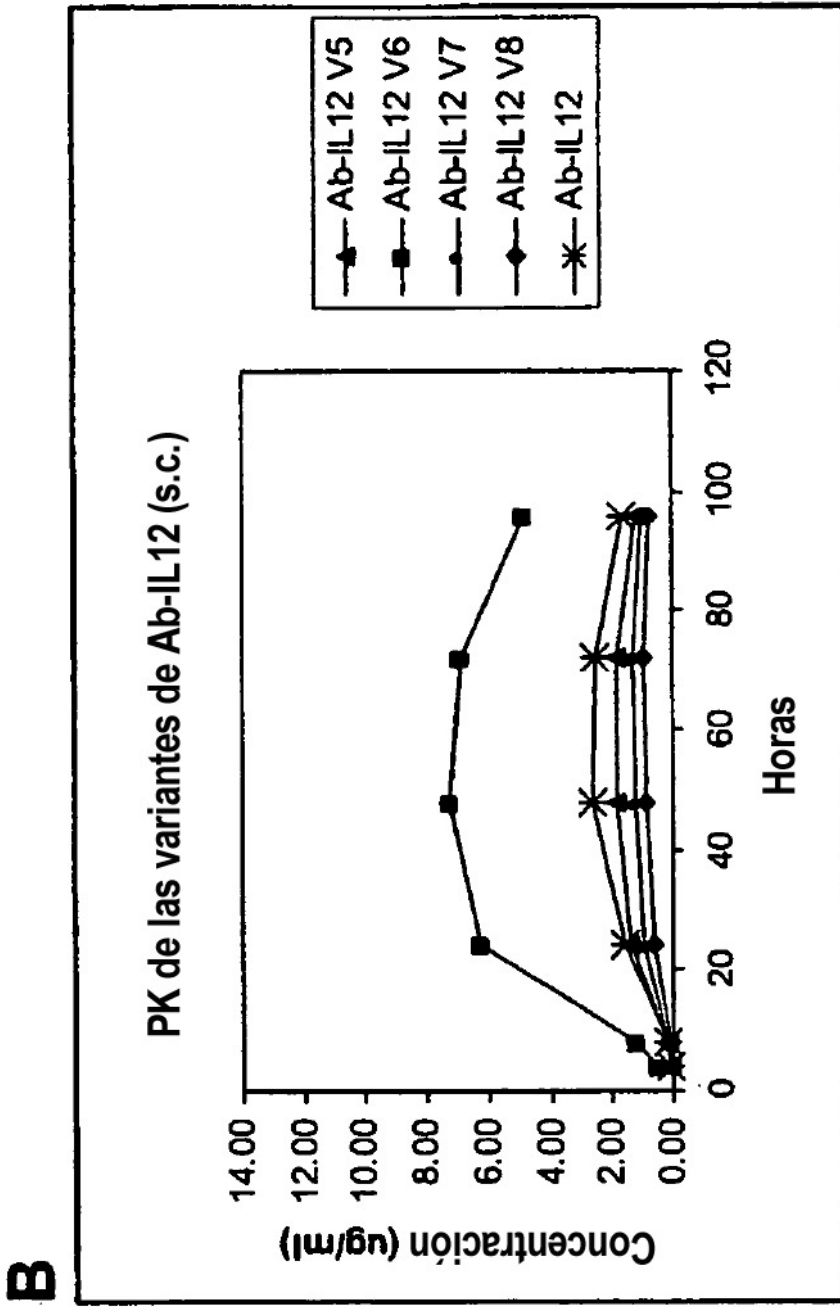


Figura 27 B

Figura 28

IWELKKDVYVVELDWYPNAPGETVVLTCDTPEEDGITWTSQSSEVLGTGKTLTIHVKEFGDAG
QYTCRKGGEALSRSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKSFLKCEAKNYSGRFTCWLTTIST
DLKFSVKSSRGSTDPRGVTCGTATLSEDLGEYKKYRVECQEGSACPAAEESLPIEVVLEAVHKL
KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRHVEVSWGYPDTWSTPHSYFSLTFCIQVQGKSK
REKKDRIFTDKTSATVICRKNAKIRVQARDRYSSFWSEWASVSCS
(SEQ ID NO:44)