

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 220**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2001 E 10184116 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2305817**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-12, composiciones, métodos y usos**

30 Prioridad:

07.08.2000 US 223358 P
29.09.2000 US 236827 P
01.08.2001 US 920262

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2017

73 Titular/es:

ORTHO BIOTECH HOLDING LLC (100.0%)
7500 Centurion Parkway
Jacksonville, FL 32256, US

72 Inventor/es:

GILES-KOMAR, JILL;
KNIGHT, DAVID M.;
PERITT, DAVID;
SCALLON, BERNHARD y
SHEALY, DAVID

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 647 220 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).

Anticuerpos anti-IL-12, composiciones, métodos y usos**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a anticuerpos específicos para la proteína interleuquina-12 (IL-12), así como a ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos anti-IL-12, células huésped, y formulaciones terapéuticas y usos de los mismos.

10

TÉCNICA RELACIONADA

15

Interleuquina-12 (IL-12) es una citoquina heterodimérica que consiste en cadenas polipeptídicas glicosiladas de 35 y 40 kD que están unidas por puentes disulfuro. La citoquina es sintetizada y secretada por las células presentadoras de antígeno incluyendo células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B, células de Langerhans y queratinocitos así como células citolíticas naturales (NK). IL-12 media una variedad de procesos biológicos y se ha denominado como factor estimulador de células NK (NKSF), factor estimulador de células T, factor de maduración de linfocitos T citotóxicos y factor de línea de células B transformadas por EBV (Curfs, J.H.A.J et al., *Clinical Microbiology Reviews*, 10:742-780 (1997)).

20

25

30

Interleuquina-12 se puede unir al receptor de IL-12 expresado en la membrana plasmática de células (por ejemplo, células T, célula NK), alterando de esta manera (por ejemplo, iniciando, previniendo) procesos biológicos. Por ejemplo, la unión de IL-12 al receptor de IL-12 puede estimular la proliferación de células T y células NK preactivadas, aumentar la actividad citolítica de células T citotóxicas (CTL), células NK y células LAK (células citolíticas activadas por linfoquina), inducir producción de interferón gamma (IFN GAMMA) por células T y células NK e inducir diferenciación de células Th0 indiferenciadas a células Th1 que producen IFN GAMMA e IL-2 (Trinchieri, G., *Annual Review of Immunology*, 13:251-276 (1995)). En particular, IL-12 es esencial para la generación de células citolíticas (por ejemplo, NK, CTL) y para montar una respuesta inmune celular (por ejemplo, una respuesta inmune mediada por células Th1). De esta manera, IL-12 es críticamente importante en la generación y regulación tanto de inmunidad protectora (por ejemplo, erradicación de infecciones) como respuestas inmunes patológicas (por ejemplo, autoinmunidad) (Hendrzak, J.A. y Brunda, M.J., *Laboratory Investigation*, 72:619-637 (1995)). Según esto, una respuesta inmune (por ejemplo, protectora o patogénica) se puede aumentar, suprimir o prevenir mediante manipulación de la actividad biológica de IL-12 in vivo, por ejemplo, por medio de un anticuerpo.

35

40

45

Los anticuerpos de mamíferos no humanos, quiméricos, policlonales (por ejemplo, anti-sueros) y/o monoclonales (Mab) y fragmentos (por ejemplo, productos de digestión proteolítica o proteínas de fusión de los mismos) son agentes terapéuticos potenciales que se están investigando en algunos casos para intentar tratar ciertas enfermedades. Sin embargo, tales anticuerpos o fragmentos pueden provocar una respuesta inmune cuando se administran a seres humanos. Tal respuesta inmune puede producir una depuración mediada por complejos inmunes de los anticuerpos o fragmentos de la circulación y hace la administración repetida no adecuada para terapia, reduciendo por lo tanto el beneficio terapéutico para el paciente y limitando la readministración del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la administración repetida de anticuerpos o fragmentos que comprenden partes no humanas puede producir enfermedad del suero y/o anafilaxia. Para evitar estos y otros problemas, se han tomado un número de propuestas para reducir la inmunogenicidad de tales anticuerpos y partes de los mismos, incluyendo la quimerización y humanización, como es bien sabido en la técnica. Estos y otros enfoques, sin embargo, aún pueden producir anticuerpos o fragmentos que tiene alguna inmunogenicidad, baja afinidad, baja avidéz, o con problemas en cultivo celular, aumento a escala, producción y/o rendimientos bajos. De esta manera, tales anticuerpos o fragmentos pueden ser menos que idealmente adecuados para la fabricación o uso como proteínas terapéuticas.

50

Según esto, existe una necesidad para proporcionar anticuerpos anti-IL-12 o fragmentos que superen uno o más de estos problemas, así como mejoras sobre anticuerpos conocidos o fragmentos de los mismos.

SUMARIO DE LA INVENCION

55

La invención proporciona un anticuerpo anti-IL-12 que tiene una región de unión a antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR1, CDR2, CDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y tres CDR de cadena ligera (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, para su uso en el tratamiento de artritis psoriásica.

60

SUMARIO DE LA DIVULGACION

65

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-IL-12 aislados humanos, de primates, roedores, mamíferos, quiméricos, humanizados y/o injertados con CDR, inmunoglobulinas, productos de la escisión y otras partes y variantes especificadas de los mismos, así como composiciones de anticuerpos anti-IL-12, ácidos nucleicos que los codifican o complementarios, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales

transgénicos, plantas transgénicas, y métodos para fabricar y usar los mismos, como se describe y permite en la presente, en combinación con lo que es conocido en la técnica.

5 La presente divulgación también proporciona al menos un anticuerpo anti-IL-12 aislado como se describe en la presente. Un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación incluye cualquier proteína o péptido que contiene la molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como pero no limitado a, al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión al ligando de las mismas, una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o la cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de las mismas, que puede incorporarse en un anticuerpo de la presente divulgación. Un anticuerpo de la divulgación puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, como pero no limitado a, un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos, y similares.

15 La presente divulgación proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden, complementario a, o que hibrida con, un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-idiotipo contra IL-12, que comprende al menos una secuencia, dominio, parte o variante especificada del mismo. La presente divulgación proporciona además vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-idiotipo contra IL-12, células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos para hacer y/o usar tales ácidos nucleicos de anticuerpos anti-idiotipo, vectores y/o células huésped.

20 La presente divulgación también proporciona al menos un método para expresar al menos un anticuerpo anti-IL-12, o un anticuerpo anti-idiotipo de IL-12, en una célula huésped, que comprende cultivar la célula huésped como se describe aquí en condiciones en donde al menos se expresa un anticuerpo anti-IL-12 en cantidades detectables y/o recuperables.

25 La presente divulgación también proporciona al menos una composición que comprende (a) un anticuerpo aislado como se describe aquí; y (b) un soporte o diluyente adecuado. El soporte o diluyente puede ser opcionalmente farmacéuticamente aceptable, según soportes o diluyentes conocidos. La composición puede opcionalmente comprender además al menos un compuesto, proteína o composición adicional.

30 La presente divulgación proporciona además al menos un método o composición de un anticuerpo anti-IL-12, para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz para modular o tratar al menos una afección relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, y/o antes de, posterior a, o durante una afección relacionada, como se describe aquí.

35 La presente divulgación proporciona además al menos una composición, dispositivo y/o método de distribución de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-IL-12, según la presente divulgación.

40 La presente divulgación proporciona además al menos un método o composición de un anticuerpo anti-IL-12, para el diagnóstico de al menos una afección relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, y/o antes de, posterior a, o durante una afección relacionada, como se describe aquí.

45 La presente divulgación también proporciona al menos una composición, dispositivo y/o método de distribución para el diagnóstico de al menos un anticuerpo anti-IL-12, según la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 Las figuras 1A y 1B son gráficos que muestran la unión dependiente de la concentración de mAb humano anti-IL-12 a IL-12 humana inmovilizada. Se hicieron diluciones en serie de los anticuerpos anti-IL-12 en BSA al 1%/PBS y se incubaron en placas recubiertas de IL-12 hr durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron dos veces con Tween 20 al 0,02% (monolaurato sorbitano de polioxietileno (20)), solución salina 0,15 M y después se ensayaron con anticuerpo específico anti-IgG kappa humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo, se desarrollaron con sustrato o-fenilendiamina (OPD) y se midió la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 490 nm.

55 Figura 2: Los carriles de izquierda a derecha en las figuras A y B contienen IL-12 humana, p40 de IL-12 humana, IL-12 murina, y marcadores de peso molecular preteñidos. La figura 2A muestra bandas teñidas a partir de proteína total. Las bandas principales en cada carril son IL-12 humana (75 kd), IL-12 humana p40 (40 kd), e IL-12 murina (75 kd). La figura 2B muestra una inmunotransferencia preparada de un gel idéntico al mostrado en la figura 2A. La membrana se hizo reaccionar con C340 seguido por IgG anti-humana de cabra marcada con HRP y se detectó específicamente IL-12 humana (monómero y multímeros) e IL-12 p40 humana solo. Una membrana control (no mostrado) que se hizo reaccionar IgG anti-humana de cabra marcada con HRP no mostró ninguna banda.

60 Figura 3: Análisis por transcripción inversa-PCR de la expresión del gen de IFN γ en PBL humanos tratados con IL-2, IL-12, IL-2+IL-12 con y sin anticuerpo anti-IL-12 C340, 8.6.2, anticuerpo isotipo control. Se hizo una

65

transcripción inversa del ARN total, se amplificó mediante PCR usando cebadores específicos del gen. También se determinó el nivel del ARNm de β -actina en cada muestra que sirvió como control para la integridad y contenido de ARNm.

La figura 4 es un histograma que muestra que el mAb humano anti-IL-12 (C340) inhibe la producción de interferón- γ (IFN γ) por células monocíticas de sangre periféricas (PBMC) CD3+ con monocitos eliminados estimuladas con IL-2 más IL-12. Las PBMC se cultivaron durante cinco horas en medio control (sin citoquinas añadidas, medio suplementado con IL-12 (0,1 ng/ml) más IL-2 (50 UI/ml) (IL-12/IL-2), medio control que contenía mAb C340 (10 μ g/ml) y medio IL-12/IL-2 que contenía mAb C340 (10 μ g/ml). El IFN γ intracelular se midió mediante inmunotinción de dos colores con CD3-PE e IFN γ -FITC. Se muestran los datos para un donante.

La figura 5 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la secreción de IFN γ por linfocitos de sangre periférica estimulados con IL-2 más IL-12 con dos lotes diferentes de un mAb humano anti-IL-12 (C340). Se cultivaron los PBL humanos (8 x 10⁶/ml) durante 24 horas con IL-2 10 U/ml, IL-2 más IL-12 400 pg/ml, o IL-2 más IL-12 y mAb C340 como se indica. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se ensayaron para IFN γ mediante EIA.

La figura 6 es un histograma que muestra la inhibición dependiente de dosis de la citotoxicidad de células LAK inducidas con IL-12 más IL-2 por un mAb humano anti-IL-12 (C340). Las células efectoras LAK (PBL humanas, 8 x 10⁶/ml) se cultivaron durante 24 horas con IL-12 (400 ng/ml) más IL-2 (10 U/ml) y mAb C340 (5000ng/ml ó 50 ng/ml, como se indica). Las células efectoras LAK se lavaron y se cultivaron con células diana Raji marcadas con 51Cr durante cuatro horas a una relación de efector a diana (E:T) de 80:1, y se midió la cantidad de 51Cr liberado en el medio tras la lisis de las células Raji. Los resultados se expresan como la media de tres donantes normales y error estándar. El control positivo de IL-12 (IL-12) son células efectoras incubadas con IL-12 y sin anticuerpo. El fondo (FONDO) es células efectoras incubadas sin IL-12 ni anticuerpo.

Las figuras 7A y 7B son histogramas que muestran que la expresión de CD95 inducida por IL-12 más IL-2 en células mononucleares CD3+ de sangre periférica se inhibe por mAb humano anti-IL-12 (C340). Se cultivaron las PBMC durante 72 horas en medio que contenía 0,1 ng/ml de IL-12 y una dosis subóptima de IL-2 (50 UI/ml) en presencia o ausencia del mAb C340 (10 μ g/ml). La expresión de CD95 se midió mediante citometría de flujo de las células teñidas con anti-CD95-FITC. La selección de poblaciones se realizó usando análisis de dos colores (CD3 ó CD56-PE frente a CD95-FITC) y dispersión de la luz frontal frente a ortogonal.

La figura 8 es un gráfico que muestra que los anticuerpos humanos recombinantes anti-IL-12 humana (rC340) se unen a IL-12 inmovilizada en una manera que es indistinguible del mAb C340 purificado. Se determinó la concentración de rC340 en los sobrenadantes de tres líneas celulares productoras de rC340, y los sobrenadantes se evaluaron para la unión a IL-12 en un ELISA. Las placas se cubrieron con IL-12 humana 2 μ g/ml y se incubaron con mAb C340 purificado del hibridoma original (estándar) o los sobrenadantes de las líneas celulares recombinantes. Se detectó el anticuerpo unido a IL-12 usando IgG (cadena pesada + cadena ligera) anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina.

Las figuras 9A-9C son gráficos que muestran la cinética de crecimiento y la cantidad de anticuerpo secretado por tres subclones de células recombinantes productoras de rC340 derivados independientemente (Figura 9A, subclon C379B; figura 9B, subclon C381A; Figura 9C, subclon C389A). Las células recombinantes se sembraron en botellas T75 a una densidad inicial de 2 x 10⁵ células/ml en medio estándar. A varios tiempos, las células se resuspendieron y se determinó el número de células vivas y la cantidad (μ g/ml) de rC340 en el medio.

DESCRIPCIÓN

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-IL-12 humanos, aislados, recombinantes y/o sintéticos, así como composiciones y moléculas de ácido nucleico codificantes que comprenden al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-IL-12 de la divulgación. La presente divulgación incluye además, pero no está limitada a, usos de tales anticuerpos, por ejemplo en composiciones diagnósticas y terapéuticas, métodos y dispositivos.

Como se usa aquí, un "anticuerpo anti-interleuquina-12", "anticuerpo anti-IL-12", "parte de anticuerpo anti-IL-12" o "fragmento de anticuerpo anti-IL-12" y/o "variante de anticuerpo anti-IL-12" y similares incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que contiene al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero no limitada a al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión al ligando de la misma, una región variable de una cadena pesada o una cadena ligera, una región constante de una cadena pesada o una cadena ligera, una región marco, o cualquier parte de la misma, o al menos una parte de un receptor o proteína de unión a IL-12, que se puede incorporar en un anticuerpo de la presente divulgación. Tal anticuerpo opcionalmente además afecta a un ligando específico, tal como pero no limitado a donde tal anticuerpo modula, disminuye, aumenta, antagoniza, agoniza, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, abroga y/o interfiere con al menos una actividad o unión de IL-12, o con la actividad o unión de receptor de IL-12, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. Como ejemplo no limitante, un anticuerpo anti-IL-12 adecuado, porción o variante especificada de la presente divulgación se puede unir al menos a una IL-12, o partes especificadas, variantes o dominios de las mismas. Un anticuerpo anti-IL-12 adecuado, parte especificada, o variante también puede opcionalmente afectar al menos a una actividad o función de IL-12, tal como pero no limitada a síntesis de ARN, ADN o proteína, liberación de IL-12,

señalización del receptor de IL-12, corte de IL-12 de membrana, actividad de IL-12, producción y/o síntesis de IL-12. El término "anticuerpo" se pretende además que abarque anticuerpos, fragmentos de digestión, partes especificadas y variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos, o que comprenden partes de anticuerpos que mimetizan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o parte del mismo, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno que se unen a IL-12 de mamífero. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a IL-12 o partes de la misma, incluyendo, pero no limitados a fragmentos Fab (por ejemplo, mediante digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), fabc (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular), están abarcados por la divulgación (ver, por ejemplo, Colligan, Immunology, supra).

Tales fragmentos se pueden producir mediante corte enzimático, técnicas sintéticas o recombinantes, como se sabe en la técnica y/o como se describe aquí. Los anticuerpos también se pueden producir en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación 5' del sitio natural de terminación. Por ejemplo, se puede diseñar un gen combinación que codifique una parte de cadena pesada F(ab')₂ para incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH₁ y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diferentes partes de los anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales, o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), bisagra, (V_L, V_H)) es sustancialmente no inmunogénica en seres humanos, con sólo cambios o variaciones minoritarios de secuencia. De forma similar, los anticuerpos designados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), de roedor (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster, y similares) y de otros mamíferos designan tales anticuerpos específicos de especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Tales cambios o variaciones opcionalmente y preferiblemente retienen o reducen la inmunogenicidad en seres humanos u otras especies relativos a los anticuerpos no modificados. De esta manera, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano se puede producir por un animal no humano o célula procariota o eucariota que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera) funcionalmente reorganizados. Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena sencilla, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en los anticuerpos nativos humanos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos hasta alrededor de ocho glicinas u otros residuos de aminoácidos, que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Tales péptidos enlazadores se considera que son de origen humano.

También se pueden usar anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para al menos una proteína IL-12, la otra es para cualquier otro antígeno. Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Debido a la variedad al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan, por ejemplo en WO 93/08829, Patentes de EE.UU. Nos. 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trauneker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

Los anticuerpos anti-IL-12 (también denominados anticuerpos IL-12) de la presente invención se pueden caracterizar opcionalmente mediante unión de alta afinidad a IL-12 y opcionalmente y preferiblemente como que tienen baja toxicidad. En particular, un anticuerpo de la invención, donde los componentes individuales, tal como la región variable, la región constante y marco, individualmente y/o colectivamente, opcionalmente y preferiblemente poseen inmunogenicidad baja, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que se pueden usar en la invención se caracterizan opcionalmente por su capacidad para tratar pacientes durante periodos extensos con mejora medible de síntomas y toxicidad baja y/o aceptable. Inmunogenicidad baja o aceptable y/o afinidad alta, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos alcanzados. "Inmunogenicidad baja" se define aquí como que aumenta las respuestas HAHA, HACA o HAMA significativas en menos de alrededor del 75%, o preferiblemente menos de alrededor del 50% de los pacientes tratados y/o que aumenta títulos bajos en el paciente tratado (menos de alrededor de 300, preferiblemente menos de alrededor de 100 medido con un inmunoensayo enzimático de doble antígeno) (ver, por ejemplo, Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)).

Utilidad

Los ácidos nucleicos aislados de la presente divulgación se pueden usar para la producción de al menos un anticuerpo anti-IL-12 o variantes especificadas del mismo, que se pueden usar para medir o efectuar en una célula, tejido, órgano o animal (incluyendo mamíferos y seres humanos), para diagnosticar, seguir, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de, al menos una afección de IL-12, seleccionada de, pero no limitada a, al menos un trastorno o enfermedad inmune, un trastorno o enfermedad cardiovascular, un trastorno o enfermedad infecciosa, maligna y/o neurológica, u otras afecciones conocidas o especificadas relacionadas con IL-12.

Tal método puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición o una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente en necesidad de tal modulación, tratamiento, alivio, prevención o reducción en los síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad eficaz puede comprender una cantidad de alrededor de 0,001 a 500 mg/kg por administración individual (por ejemplo, bolus), múltiple o continua, o para alcanzar una concentración en suero de 0,01-5000 µg/ml de concentración en suero por administración individual, múltiple o continua, o cualquier intervalo eficaz o valor en el mismo, como se hace y determina usando métodos conocidos, como se describe aquí o se conoce en las técnicas relevantes.

Citas

Todas las publicaciones o patentes citadas aquí muestran el estado de la técnica en el momento de la presente invención y/o proporcionan descripción y ejecutabilidad de la presente invención. Las publicaciones se refieren a cualquier publicación científica o de patente, o cualquier otra información disponible en cualquier formato incluyendo todos los formatos registrados, electrónicos o impresos. Se mencionan específicamente las siguientes referencias: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Anticuerpos de la presente invención

Al menos un anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención se puede opcionalmente producir por una línea celular, una línea celular mezclada, una célula inmortalizada o una población clónica de células inmortalizadas, como se sabe bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Se pueden preparar anticuerpos humanos que son específicos para proteínas IL-12 humanas o fragmentos de los mismos contra un antígeno inmunogénico apropiado, tal como proteína IL-12 aislada y/o proteína IL-12 o una parte de la misma (incluyendo moléculas sintéticas, tal como péptidos sintéticos). Se pueden hacer de forma similar otros anticuerpos de mamíferos específicos o generales. La preparación de antígenos inmunogénicos, y la producción de anticuerpos monoclonales se pueden realizar usando cualquier técnica adecuada.

En un planteamiento, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no limitada a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, o similares, o heteromiomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula fusionada derivada de las mismas, o cualquier otra línea celular adecuada conocida en la técnica. Ver, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y similares, con células productoras de anticuerpos, tal como, pero no limitado a células que contienen células inmunes o B aisladas o clonadas de bazo, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células, o cualquier otra célula que expresa secuencias constantes o variables o marco o CDR de cadena pesada o ligera, como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN recombinante o endógeno, vírico, bacteriano, de alga, procariota, de anfibio, insecto, reptil, pez, mamífero, roedor, equino, ovino, de cabra, oveja, primate, eucariota, genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, monocatenario, bicatenario, tricatenario, hibridado, y similares o cualquier combinación de los mismos. Ver, por ejemplo, Ausubel, supra, y Colligan, Immunology, supra, capítulo 2.

También se pueden obtener células productoras de anticuerpo de sangre periférica o, preferiblemente de bazo o ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que se han inmunizado con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar ácidos nucleicos endógenos o heterólogos que codifican un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar usando condiciones selectivas de cultivo u otros métodos adecuados conocidos, y clonar mediante dilución limitante o separación de células, u otros métodos

conocidos. Se pueden seleccionar las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

5 Se pueden usar otros métodos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad precisa, incluyendo, pero no limitado a, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una librería de péptidos o proteínas, por ejemplo, pero no limitado a, bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc, o similar, librería de presentación; por ejemplo, disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Escocia, UK; BioInvent, Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Ver, por ejemplo, EP 368684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; 10 PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); US 4704692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); o péptidos o proteínas generados estocásticamente - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, ahora Applied Molecular Evolution (AME) o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), así como patentes y solicitudes relacionadas) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe aquí. Tales técnicas, incluyen, pero no están limitadas a, presentación 20 en ribosomas (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (Mayo 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); tecnologías de producción de anticuerpo por célula individual (por ejemplo, método de anticuerpo de linfocito seleccionado ("SLAM") (patente de EE.UU. No. 5627052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgota de gel y citometría de flujo (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); selección de células B (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Ámsterdam, Países Bajos (1988)).

30 También se pueden usar métodos para manipular o humanizar anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado o manipulado tiene uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero no limitado a ratón, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable constante u otro "importado" de una secuencia humana conocida. Las secuencias de IgG humanas conocidas se divulgan, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/Biolinks/Immunology.html; www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isacnet.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/int-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:81041/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.nimz.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spotech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud de EE.UU. (1983). Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, aumentar o modificar la unión, afinidad, asociación, disociación, avidéz, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se sabe en la técnica. Generalmente parte o todas las secuencias CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se cambian con 55 aminoácidos humanos u otros. Los anticuerpos también se pueden opcionalmente humanizar con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este fin, los anticuerpos humanizados se pueden preparar opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas están normalmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas de inmunoglobulinas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de los posibles papeles de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de la inmunoglobulina, es decir, el análisis de residuos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos FR 60 a partir de las secuencias consenso e importadas de modo que se alcance la característica deseada del anticuerpo, tal

como afinidad aumentada para el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno. Se puede realizar la humanización o manipulación de anticuerpos de la presente invención usando cualquier método conocido, tal como pero no limitado a los descritos en, Winter (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534 (1988)), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993), patentes de EE.UU. Nos: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; W090/14443, W090/14424, W090/14430, EP 229246.

El anticuerpo anti-IL-12 también se puede generar opcionalmente mediante inmunización de un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano, y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se describe aquí y/o como se conoce en la técnica. Las células que producen un anticuerpo humano anti-IL-12 se pueden aislar de tales animales e inmortalizar usando métodos adecuados, tal como los métodos descritos aquí.

Se pueden producir ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que se unen a antígenos humanos mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero no limitados a las patentes de EE.UU. Nos. 5770428, 5569825, 5545806, 5625126, 5625825, 5633425, 5661016 y 5789650 concedida a Lonberg et al.; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al., patente de EE.UU. No. 5545807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. *Nature* 368:856-859 (1994), Taylor et al., *Int. Immunol.* 6(4):579-591 (1994), Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995) y Fishwald et al., *Nat Biotechnol* 14(7): 845-851 (1996). Generalmente, estos ratones comprenden al menos un transgén que comprende ADN de al menos un locus de inmunoglobulina humana que está funcionalmente reorganizado, o que puede sufrir reorganización funcional. Los loci endógenos de inmunoglobulina en tales ratones se pueden desorganizar o deleccionar para eliminar la capacidad del animal de producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

Se puede realizar de forma conveniente el cribado de anticuerpos para unión específica a proteínas o fragmentos similares usando librerías de presentación de péptidos. Este método implica el cribado de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseada. El cribado de anticuerpos de librerías de presentación de péptidos es bien conocido en la técnica. Las secuencias de péptidos presentadas pueden tener desde 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, frecuentemente de 5-100 aminoácidos de longitud, y con frecuencia desde alrededor de 8 a 25 aminoácidos de longitud. Además de métodos químicos de síntesis para generar librerías de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN recombinante. Un tipo implica la presentación de una secuencia peptídica en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica particular presentada. Tales métodos se describen en las publicaciones de patentes PCT Nos. 91/17271, 91/18980, 91/19818, y 93/08278. Otros sistemas para generar librerías de péptidos tienen aspectos tanto de síntesis química in vitro como de métodos recombinantes. Ver, las publicaciones de patente de PCT Nos. 92/05258, 92/14843 y 96/19256. Ver también, las patentes de EE.UU. Nos. 5658754; y 5643768. Las librerías de presentación de péptidos, vectores y kits de cribado están comercialmente disponibles de tales suministradores como Invitrogen (Carlsbad, CA), y Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Ver, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax; 5885793, cedida a Cambridge antibody Technologies; 5750373, cedida Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedidas a Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra.

También se pueden preparar los anticuerpos de la presente invención usando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-12 para proporcionar animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que produzcan tales anticuerpos en su leche. Tales animales se pueden proporcionar usando métodos conocidos. Ver, por ejemplo, pero no limitado a, las patentes de EE.UU. nos. 5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616; 5565362; 5304489, y similares.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar además usando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-12 para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero no limitado a tabaco y maíz) que producen tales anticuerpos, partes especificadas o variantes en las partes de la planta o en células cultivadas de ellas. Como ejemplo no limitante, se han usado con éxito hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo usando un promotor inducible. Ver, por ejemplo, Cramer et al, *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240:95-118 (1999) y las referencias citadas allí. Además, se ha usado maíz transgénico para expresar

proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas de fuentes naturales. Ver, por ejemplo, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) y las referencias citadas allí. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas incluyendo fragmentos de anticuerpos, tal como anticuerpos de cadena sencilla (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculo de patata. Ver, por ejemplo, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) y las referencias citadas allí. De esta manera, los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir usando plantas transgénicas, según métodos conocidos. Ver también, por ejemplo, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); y las referencias citadas allí.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir a IL-12 con un amplio rango de afinidades (K_D). En una forma de realización preferida, al menos un mAb humano de la presente invención se puede unir opcionalmente a IL-12 humana con gran afinidad. Por ejemplo, un mAb humano se puede unir a IL-12 con una K_D igual a o menor de alrededor de 10^{-7} M, tal como pero no limitada a 0,1-9,9 (o cualquier rango o valor dentro) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o cualquier rango o valor dentro del mismo.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado. (Ver, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," En *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992); y los métodos descritos allí). La afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno particular medida puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH). De esta manera, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D , K_a , K_d) se hacen preferiblemente con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como el tampón descrito aquí.

Moléculas de ácido nucleico

Usando la información proporcionada aquí, se puede obtener una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación que codifica al menos un anticuerpo anti-IL-12 usando métodos descritos aquí o conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluyendo, pero no limitado a, ADNc y ADN genómico obtenidos mediante clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier parte de al menos una hebra del ADN o ARN puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada hebra anti-sentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas divulgadas aquí incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco abierto de lectura (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitado a, al menos una parte especificada de al menos una CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1-3) o cadena ligera (por ejemplo, SEQ ID NOS: 4-6); moléculas de ácido nucleico que comprenden la región codificante de un anticuerpo anti-IL-12 o región variable (por ejemplo, SEQ ID NOS: 7, 8); y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifican al menos un anticuerpo anti-IL-12 como se describe aquí y/o como se conoce en la técnica. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. De esta manera, sería rutinario para el experto en la materia generar tales variantes degeneradas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-IL-12 específicos de la presente invención. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., supra. Ejemplos no limitantes de moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen SEQ ID NO: 8, correspondiente a ejemplos no limitantes de un ácido nucleico que codifica, respectivamente, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, región variable de HC y región variable de LC.

Como se indica aquí, las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-12 pueden incluir, pero no están limitadas a, aquellas que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo, por sí mismo; la secuencia codificante del anticuerpo entero o una parte del mismo; la secuencia codificante de un anticuerpo, fragmento o parte, así como secuencias adicionales, tal como la secuencia codificante de al menos un péptido señal líder o de fusión, con o sin las secuencias codificantes anteriormente mencionadas, tal como al menos un intrón, junto con secuencias adicionales no codificantes, incluyendo, pero no limitadas a, secuencias no codificantes 5' y 3', tal como las secuencias transcritas no traducidas que desempeñan un papel en la transcripción, procesamiento de ARNm, incluyendo señales de ajuste y poliadenilación (por ejemplo – unión a ribosomas y estabilidad de ARNm); una secuencia codificante adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. De esta manera, la secuencia que codifica un anticuerpo se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o parte de anticuerpo.

Polinucleótidos que hibridan selectivamente con un polinucleótido descrito aquí

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados que hibridan en condiciones selectivas de hibridación con los polinucleótidos divulgados aquí. De esta manera, se pueden usar los polinucleótidos para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos. Por ejemplo, se pueden usar los polinucleótidos para identificar, aislar, o amplificar clones parciales o completos en una genoteca depositada. En algunos casos, los polinucleótidos son secuencias de ADN genómico o ADNc aisladas, o de otra manera complementarias a, un ADNc de una genoteca de ácido nucleico humano o de mamífero.

Preferiblemente, la genoteca de ADNc comprende al menos el 80% de secuencias completas, preferiblemente al menos el 85% o el 90% de secuencias completas, y más preferiblemente al menos el 95% de secuencias completas. Las genotecas de ADNc se pueden normalizar para aumentar la representación de especies infrecuentes. Típicamente, pero no exclusivamente, se emplean condiciones de hibridación poco rigurosas o moderadas con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida respecto a las secuencias complementarias. Opcionalmente se pueden emplear condiciones moderadas y muy rigurosas para secuencias de mayor identidad. Las condiciones poco rigurosas permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen alrededor del 70% de identidad de secuencia y se pueden emplear para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Opcionalmente, los polinucleótidos codificarán al menos una parte de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos aquí. Los polinucleótidos abarcan secuencias de ácidos nucleicos que se pueden emplear para la hibridación selectiva a un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; Colligan, *supra*.

Construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente divulgación se pueden hacer usando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de las mismas, como es bien sabido en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden comprender de forma conveniente secuencias además de un polinucleótido de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede insertar un sitio de multi-clonación que comprende uno o más sitios de endonucleasas de restricción en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. Además, se pueden insertar secuencias traducibles para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente divulgación. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente divulgación. El ácido nucleico de la presente divulgación – excluyendo las secuencias codificantes – es opcionalmente un vector, adaptador o enlazador para la clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente divulgación.

Se pueden añadir secuencias adicionales a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y enlazadores es bien conocido en la técnica. (Ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*).

Métodos recombinantes para construir ácidos nucleicos

Las composiciones aisladas de ácido nucleico de esta divulgación, tales como ARN, ADNc, ADN genómico, o cualquier combinación de los mismos, se pueden obtener de fuentes biológicas usando cualquiera de las metodologías de clonación conocidas por los expertos en la materia. En algunas formas de realización, se usan sondas de oligonucleótidos que hibridan de forma selectiva, en condiciones rigurosas, con los polinucleótidos de la presente divulgación para identificar la secuencia deseada en una genoteca de ADNc o ADN genómico. El aislamiento de ARN y la construcción de genotecas de ADNc o genómico, es bien conocido para el experto en la materia. (Ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*).

Métodos de cribado y aislamiento de ácidos nucleicos

Se puede cribar una genoteca de ADNc o genómico usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido, tales como los divulgados aquí. Se pueden usar las sondas para hibridar con secuencias de ADN genómico o ADNc para aislar genes homólogos en el mismo o en diferentes organismos. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden emplear varios grados de rigor de hibridación en el ensayo; y bien el medio de hibridación o el de lavado puede ser riguroso. Cuando las condiciones de hibridación se hacen más rigurosas, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y la diana para se produzca la formación de un dúplex. Se puede controlar el grado de rigor mediante uno o más de temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un solvente parcialmente desnaturizante tal como formamida. Por ejemplo, el rigor de la hibridación se varía convenientemente cambiando la polaridad de la reacción reactiva mediante, por ejemplo, la manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo del 0% al 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido

para la unión detectable variará según el rigor del medio de hibridación y/o del medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente del 100%, o del 70-100%, o cualquier intervalo o valor dentro del mismo. Sin embargo, se debe entender que se pueden compensar las variaciones minoritarias de secuencia en las sondas y cebadores reduciendo el rigor del medio de hibridación y/o de lavado.

5

Los métodos de amplificación de ARN o ADN se conocen bien en la técnica y se pueden usar sin experimentación excesiva, basado en las enseñanzas y directrices presentadas aquí.

10

Los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no están limitados a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (ver por ejemplo las patentes de EE.UU. Nos. 4683195, 4683202, 4800159, 4965188, a Mullis, et al.; 4795699 y 4921794 a Tabor, et al.; 5142033 a Innis; 5122464 a Wilson, et al.; 5091310 a Innis; 5066584 a Gyllensten, et al.; 4889818 a Gelfand, et al.; 4994370 a Silver, et al.; 4766067 a Biswas; 4656134 a Ringold) y amplificación mediada por ARN que usa ARN antisentido a la secuencia diana como molde para la síntesis de ADN bicatenario (Patente de EE.UU. No. 5130238 a Malek et al., con el nombre comercial de NASBA). (Ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*).

15

20

Por ejemplo, se puede usar la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias de polinucleótidos y genes relacionados directamente de genotecas de ADN genómico o ADNc. La PCR y otros métodos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas a ser expresadas, para hacer ácidos nucleicos para usar como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en muestras, para la secuenciación de ácidos nucleicos, o para otros fines. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de métodos de amplificación *in vitro* se encuentran en Berger, *supra*, Sambrook, *supra*, y Ausubel, *supra*, así como en Mullis, et al., patente de EE.UU. No. 4683202 (1987); e Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). En la técnica se conocen kits comercialmente disponibles para la amplificación genómica por PCR. Ver, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Además, por ejemplo, se puede usar la proteína 32 del gen de T4 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de productos de PCR largos.

25

30

Métodos sintéticos para construir ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente divulgación también se pueden preparar mediante síntesis química directa por métodos conocidos (ver, por ejemplo, Ausubel, et al., *supra*). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido monocatenario, que se puede convertir a ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como molde. El experto en la materia reconocerá que mientras la síntesis química de ADN puede estar limitada a secuencias de alrededor de 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

35

40

Casetes de expresión recombinantes

La presente divulgación proporciona además casetes de expresión recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la presente divulgación. Se puede usar una secuencia de ácido nucleico de la presente divulgación, por ejemplo un ADNc o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo de la presente divulgación, para construir un casete de expresión recombinante que se puede introducir en al menos una célula huésped deseada. Un casete de expresión recombinante típicamente comprenderá un polinucleótido de la presente divulgación operativamente unido a secuencias reguladoras del inicio de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped deseada. Se pueden emplear promotores tanto heterólogos como no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de la presente divulgación.

45

50

En algunas formas de realización, se pueden introducir ácidos nucleicos aislados que sirven como promotor, potenciador, u otros elementos en la posición adecuada (secuencia arriba, secuencia abajo o en un intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de modo que aumente o disminuya la expresión de un polinucleótido. Por ejemplo, se pueden cambiar los promotores endógenos *in vivo* o *in vitro* mediante mutación, delección y/o sustitución.

55

Vectores y células huésped

La presente divulgación también se refiere a vectores que incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente divulgación, células huésped que están genéticamente manipuladas con los vectores recombinantes, y la producción de al menos un anticuerpo anti-IL-12 mediante técnicas recombinantes, como se sabe bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., *supra*; Ausubel, et al., *supra*.

60

65

Los polinucleótidos se pueden unir opcionalmente a un vector que contiene un marcador de selección para su propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar *in vitro* usando una línea celular empaquetadora apropiada y después transducir en las células huésped.

El inserto de ADN debe estar operativamente unido a un promotor apropiado. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones preferiblemente incluirá un inicio de traducción al principio y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) colocado apropiadamente al final del ARNm a ser traducido, con UAA y UAG preferidos para expresión en células de mamíferos o eucariotas.

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente, pero opcionalmente, al menos un marcador de selección. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no están limitados a, resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, patentes de EE.UU. Nos. 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017), ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico, o glutamina sintetasa (GS, patentes de EE.UU. Nos. 5122464; 5770359; 5827739) para cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias o procariontes. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente son conocidos en la técnica. Los vectores serán fácilmente aparentes al experto en la materia. La introducción de una construcción de vector en una célula huésped se puede realizar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección medida por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos están descritos en la técnica, tal como Sambrook, supra, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Se puede expresar al menos un anticuerpo de la presente invención en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula huésped, durante la purificación, o durante el manejo y almacenamiento posteriores. Además, se pueden añadir grupos peptídicos a un anticuerpo de la presente invención para facilitar la purificación. Tales regiones se pueden eliminar antes de la preparación final de un anticuerpo o al menos un fragmento del mismo. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tal como Sambrook, supra, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, supra, capítulos 16, 17 y 18.

El experto en la materia está informado de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención.

De forma alternativa, los ácidos nucleicos de la presente divulgación se pueden expresar en una célula huésped mediante encendido (mediante manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5580734, 5641670, 5733746, y 5733761.

Ilustrativo de cultivos celulares útiles para la producción de anticuerpos, partes especificadas o variantes de los mismos, son células de mamífero. Los sistemas de células de mamífero con frecuencia estarán en forma de monocapas de células aunque también se pueden usar suspensiones o biorreactores de células de mamífero. Se han desarrollado en la técnica un número de líneas de células huéspedes adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas, e incluyen, las líneas celulares COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610), y BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa y similares, que están fácilmente disponibles de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células huésped preferidas incluyen células de origen linfocítico tal como células de mieloma y linfoma. Células huésped particularmente preferidas son células P3X63Ag8.653 (número de acceso de ATCC CRL-1580) y células SP2/0-Ag14 (número de acceso de ATCC CRL-1851). En una forma de realización particularmente preferida, la célula recombinante es una célula P3X63Ag8.653 o una célula SP2/0-Ag14.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir uno o más de las siguientes secuencias de control de la expresión, tal como, pero no limitadas a un origen de replicación; un promotor (por ejemplo, los promotores tardío o temprano de SV40, el promotor de CMV (patentes de EE.UU. Nos. 5168062, 5385839) un promotor tk de HSV, un promotor pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor EF-1 alfa (patente de EE.UU. No. 5266491), al menos un promotor de inmunoglobulina humana; un potenciador, y/o sitios de información de procesamiento, tal como sitios de unión a ribosomas, sitios de ajuste de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición de poli A del Ag T grande de SV40), y secuencias de terminación de la transcripción. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., supra; Sambrook et al., supra. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o están disponibles, por ejemplo, del catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo de Líneas Celulares e Hibridomas (www.atcc.org) o de otras fuentes comerciales conocidas.

Cuando se emplean células huésped eucariotas, típicamente se incorporan en el vector secuencias de poliadenilación o de terminación de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. También se pueden incluir secuencias para un ajuste

exacto del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de ajuste es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Además, se pueden incorporar en el vector secuencias génicas para el control de la replicación en la célula huésped, como se sabe en la técnica.

5 Purificación de un anticuerpo

Se puede recuperar y purificar un anticuerpo anti-IL-12 de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo, pero no limitados a, purificación con proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. También se puede emplear cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Ver, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, los capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente purificados, productos de procedimientos de síntesis química, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, vegetales superiores, insecto y mamífero. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede estar glicosilado o puede estar no glicosilado, con glicosilado preferido. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tal como Sambrook, supra, secciones 17.37-17.42, Ausubel, supra, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science, supra, capítulo, 12-14.

Anticuerpos anti-IL-12

Los anticuerpos aislados de la presente divulgación comprenden un anticuerpo codificado por cualquiera de los polinucleótidos de la presente divulgación como se discute más completamente aquí, o cualquier anticuerpo aislado o preparado. Preferiblemente, el anticuerpo humano se une a IL-12 humana y, de esta manera neutraliza parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo que neutraliza parcialmente o preferiblemente sustancialmente al menos una actividad biológica de al menos una proteína IL-12 o fragmento se puede unir a la proteína o fragmento y de esta manera inhibe la actividad mediada a través de la unión de IL-12 al receptor de IL-12 o través de otros mecanismos dependientes o mediados por IL-12. Como se usa aquí, el término "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de IL-12 en aproximadamente el 20-120%, preferiblemente en al menos aproximadamente el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98, el 98, el 99, el 100% o más dependiendo del ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-IL-12 para inhibir una actividad dependiente de IL-12 se evalúa preferiblemente mediante al menos un ensayo adecuado de proteína o receptor de IL-12, como se describe aquí y/o como se conoce en la técnica. Un anticuerpo humano de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una forma de realización, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada IgG o fragmento definido, por ejemplo, al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de este tipo se pueden preparar empleando un ratón transgénico u otro mamífero transgénico no humano que comprende al menos un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, IgG, IgA e IgM (por ejemplo, γ 1, γ 2, γ 3, γ 4) como se describe aquí y/o como se sabe en la técnica. En otra forma de realización, el anticuerpo humano anti-IL-12 humana comprende una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera IgG1.

Al menos un anticuerpo de la divulgación se une a al menos un epítipo especificado específico para al menos una proteína IL-12, subunidad, fragmento, parte o cualquier combinación de las mismas. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región de unión a anticuerpo que comprende al menos una parte de dicha proteína, epítipo que preferiblemente comprende al menos una parte extracelular, soluble, hidrofílica, externa o citoplásmica de dicha proteína. El al menos un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 1-3 aminoácidos a la parte especificada entera de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo humano o fragmento que se une al antígeno de la presente invención comprende una región de unión al antígeno que comprende en tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tienen la secuencia de aminoácidos de las CDR 1, 2 y/o 3 correspondientes (por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3) y tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tienen la secuencia de aminoácidos de las CDR 1, 2 y/o 3 correspondientes (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6). Las tres DCR de cadena pesada y las tres DCR de cadena ligera del anticuerpo o fragmento que se une al antígeno tienen la secuencia de aminoácidos de la CDR correspondiente de al menos uno de mAB 12B75, C340, o cualquier otro descrito aquí. Tales anticuerpos pueden prepararse uniendo químicamente juntas las varias porciones (por ejemplo, CDR, marco) del anticuerpo usando técnicas convencionales, preparando y expresando (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo usando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante o usando cualquier otro método adecuado.

El anticuerpo anti-IL-12 puede comprender al menos una región variable de cadena pesada o ligera que tiene una secuencia de aminoácidos definida. Por ejemplo, en una realización preferida, el anticuerpo anti-IL-12 comprende

al menos una de al menos una región variable de la cadena pesada, que tiene opcionalmente la secuencia de SEQ ID NO: 7 y/o al menos una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8. Se pueden preparar anticuerpos que se unen a IL-12 humana y que comprenden un región variable de cadena pesada o ligera definida usando métodos adecuados, tal como presentación en fagos (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol Med*, 1(5):863-868 (1993)) o métodos que emplean animales transgénicos, conocidos en la técnica y/o descritos aquí. Por ejemplo, se puede inmunizar un ratón transgénico, que comprende un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizado y un transgén que comprende ADN de un locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana que puede sufrir reorganización funcional, con IL-12 humana o un fragmento de la misma para provocar la producción de anticuerpos. Si se desea, se pueden aislar las células productoras de anticuerpos y se pueden preparar hibridomas u otras células inmortalizadas productoras de anticuerpo como se describe aquí y/o como se sabe en la técnica. De forma alternativa, el anticuerpo, la parte especificada o variante se puede expresar usando el ácido nucleico codificante o la parte del mismo en una célula huésped adecuada.

Una sustitución conservadora de aminoácido se refiere al cambio de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofilicidad) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservadoras incluyen el cambio de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparragina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y). K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Códigos de aminoácidos

Los aminoácidos que hacen los anticuerpos anti-IL-12 de la presente invención con frecuencia se abrevian. Las designaciones de aminoácidos se pueden indicar designando el aminoácido mediante su código de una letra, su código de tres letras, nombre, o codón(es) de tres nucleótidos como está bien entendido en la técnica (ver Alberts, B., *et al.*, *Molecular Biology of The Cell*, Tercera Ed., Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1994):

CÓDIGO DE UNA LETRA	CÓDIGO DE TRES LETRAS	NOMBRE	CODON(ES) DE TRES NUCLEÓTIDOS
A	Ala	Alanina	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Cisteína	UGC, UGU
D	Asp	Ácido aspártico	GAC, GAU
E	Glu	Ácido glutámico	GAA, GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC, UUU
G	Gly	Glicina	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Histidina	CAC, CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Lisina	AAA, AAG
L	Leu	Leucina	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparragina	AAC, AAU
P	Pro	Prolina	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA, CAG
R	Arg	Arginina	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Serina	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Treonina	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Valina	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Triptófano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC, UAU

Un anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención puede incluir una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, bien de mutaciones naturales o por manipulación humana, como se especifica aquí.

Por supuesto, el número de sustituciones que haría el experto en la materia depende de muchos factores, incluyendo los descritos anteriormente. En términos generales, el número de sustituciones, inserciones o deleciones

de aminoácidos para cualquier proteína, fragmento o variante anti-IL-12 derivada de Ig no será más de 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como de 1-30 o cualquier intervalo o valor dentro del mismo, como se especifica aquí.

5 Los aminoácidos en un anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención que son esenciales para la función se pueden identificar mediante métodos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido con alanina (por ejemplo, Ausubel, supra, capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se ensayan después para su actividad biológica, tal como, pero no limitada a al menos una actividad neutralizante de IL-12. Los sitios que son críticos para la unión al anticuerpo también se pueden identificar mediante análisis estructural tales como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje de fotoafinidad (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

10 Como apreciará el experto en la materia, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos el 20%, el 30%, o el 40%, y preferiblemente de al menos el 50%, el 60%, o el 70%, y lo más preferiblemente de al menos el 80%, el 90%, o el 95%-100% de la del anticuerpo nativo (no sintético), endógeno o afín y conocido. Los métodos de ensayar y cuantificar medidas de actividad enzimática y especificidad de sustrato, son bien conocidos para el experto en la materia.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanos, como se describe aquí, que están modificados mediante la unión covalente de un grupo orgánico. Tales modificaciones pueden producir un anticuerpo con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, vida media en suero *in vivo* aumentada). El grupo orgánico puede ser un grupo polimérico hidrofílico lineal o ramificado, un grupo ácido graso, o un grupo éster de ácido graso. En formas de realización particulares, el grupo polimérico hidrofílico puede tener un peso molecular desde alrededor de 800 hasta alrededor de 120.000 Dalton y puede ser un polialcano glicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG)), polímero de hidrato de carbono, polímero de aminoácido o polivinilpirrolidona, y el grupo ácido graso o éster de ácido graso puede comprender desde alrededor de ocho hasta alrededor de cuarenta átomos de carbono.

20 Los anticuerpos modificados de la invención pueden comprender uno o más grupos orgánicos que están unidos de forma covalente, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada grupo orgánico que está unido a un anticuerpo de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrofílico, un grupo ácido graso, o un grupo éster de ácido graso. Como se usa aquí, el término "ácido graso" abarca ácidos monocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Un "grupo polimérico hidrofílico", como se usa aquí el término, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, polilisina es más soluble en agua que en octano. De esta manera, un anticuerpo modificado mediante la unión covalente de polilisina está abarcado por la invención. Los polímeros hidrofílicos adecuados para modificar los anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcano glicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilenglicol (mPEG), PPG y similares), hidratos de carbono (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de aminoácidos hidrofílicos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcanos (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinilpirrolidona. Preferiblemente, el polímero hidrofílico que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular desde alrededor de 800 hasta alrededor de 150.000 Dalton como entidad molecular separada. Por ejemplo, se pueden usar PEG₅₀₀₀ y PEG_{20.000}, en donde el subíndice es el peso molecular medio del polímero en Dalton. El grupo polimérico hidrofílico puede estar sustituido con uno hasta alrededor de seis grupos alquilo, ácido graso o éster de ácido graso. Los polímeros hidrofílicos que están sustituidos con un grupo ácido graso o éster de ácido graso se pueden preparar empleando métodos adecuados. Por ejemplo, se puede acoplar un polímero que comprende un grupo amina a un carboxilato del ácido graso o el éster de ácido graso, y se puede acoplar un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonildiimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso a un grupo hidroxilo en un polímero.

25 Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar los anticuerpos de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), *cis*-Δ⁹-octadecanoato (C₁₈, oleato), todo *cis*-Δ^{5,8,11,14}-eicosatetraenoato (C₂₀, araquidonato), ácido octanedioico, ácido tetradecanedioico, ácido octadecanedioico, ácido docosanedioico, y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender desde uno hasta alrededor de doce, preferiblemente desde uno hasta alrededor de seis, átomos de carbono.

30 Los anticuerpos humanos modificados se pueden preparar usando métodos adecuados, tal como mediante reacción con uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" como se usa el término aquí, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrofílico, un ácido graso, un éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un "grupo activador" es un grupo químico o grupo funcional que puede, en las condiciones

adecuadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando de esta manera un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos activadores que reaccionan con amina incluyen grupos electrofílicos tal como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) y similares. Los grupos activadores que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Un grupo funcional aldehído se puede acoplar a moléculas que contienen amina o hidracida, y un grupo azida puede reaccionar con grupos de fósforo trivalente para formar enlaces fosforamido o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos activadores en moléculas son conocidos en la técnica (ver por ejemplo, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo activador se puede unir directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrofílico, ácido graso, éster de ácido graso), o mediante un grupo enlazador, por ejemplo un grupo divalente de C₁-C₁₂ en donde se pueden cambiar uno o más átomos de carbono por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los grupos enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- y -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-. Los agentes modificadores que comprenden un grupo enlazador se pueden producir, por ejemplo, haciendo reaccionar mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato del ácido graso. El grupo protector Boc se puede eliminar del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que se puede acoplar a otro carboxilato como se describe, o se puede hacer reaccionar con anhídrido maleico y ciclar el producto resultante para producir un derivado maleimido activado del ácido graso. (Ver, por ejemplo, Thompson et al., WO 92/16221).

Los anticuerpos modificados se pueden producir haciendo reaccionar un anticuerpo humano con un agente modificador. Por ejemplo, los grupos orgánicos se pueden unir al anticuerpo en una forma no específica de sitio empleando un agente modificador que reacciona con amina, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Los anticuerpos humanos modificados también se pueden preparar reduciendo los puentes disulfuro (por ejemplo, puente disulfuro intra-cadena) de un anticuerpo. El anticuerpo reducido se puede hacer reaccionar después con un agente modificador que reacciona con tiol para producir el anticuerpo modificado de la invención. Los anticuerpos humanos modificados que comprenden un grupo orgánico que está unido a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención se pueden preparar usando métodos adecuados, tal como proteólisis inversa (Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos en Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO CONTRA COMPOSICIONES PROTEICAS DERIVADAS DE IG ANTI-IL-12

Además de los anticuerpos anti-IL-12 monoclonales o quiméricos, la presente divulgación también está dirigida a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para tales anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. Se puede preparar el anti-Id inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) que la fuente del anticuerpo Id con el anticuerpo o una región que contiene la CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

COMPOSICIONES DE PROTEÍNAS DERIVADAS DE IG ANTI-IL-12

La presente divulgación también proporciona al menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más anticuerpos anti-IL-12 de los mismos, como se describe aquí y/o como se sabe en la técnica que se proporcionan en una composición, mezcla o forma no natural. Las composiciones de anticuerpos anti-IL-12 de la presente invención pueden además comprender al menos uno de cualquier cantidad adecuada y eficaz de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo contra TNF o fragmento, un receptor soluble de TNF o fragmento, proteínas de fusión de los mismos, o antagonistas de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofín, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio y oro, sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalquina), un relajante muscular, un narcótico, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasítico, un antivírico, un carbapenemo, cefalosporina, una fluroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutriente, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitúsiígeno, un antiúlcera, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de remplazo hormonal, un modulador de receptor de estrógeno, midriático, un ciclopléxico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un

estimulante, donepezil, tacrina, una medicación contra el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Ejemplos no limitantes de tales citoquinas incluyen, pero no están limitados a, cualquiera de IL-1 a IL-23. Las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Wells et al., eds.,
 5 Pharmacotherapy Handbook, 2ª Edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Edición Deluxe, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Tales anticancerosos o antiinfecciosos también pueden incluir moléculas de toxinas que se asocian, unen, coformulan o coadministran con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede opcionalmente actuar para aniquilar selectivamente la célula o tejido patológico. La célula patológica puede ser una célula cancerosa u otra. Tales toxinas pueden ser, pero no están limitadas a, toxina purificada o recombinante o fragmento de toxina que comprende al menos un dominio citotóxico funcional de la toxina, por ejemplo, seleccionado de al menos uno de ricina, toxina de la difteria, una toxina de veneno, o una toxina bacteriana. El término toxina también incluye tanto endotoxinas como exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus natural, mutante o recombinante que pueden producir cualquier afección patológica en seres humanos y otros mamíferos, incluyendo choque tóxico, que puede producir la muerte. Tales toxinas pueden incluir, pero no están limitadas a, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* enterotoxigénica (LT), enterotoxina estable al calor (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, toxina-1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), enterotoxina A (SEA), B (SEB), ó C (SEC) de *Staphylococcus*, enterotoxinas de *Streptococcus* y similares. Tales bacterias incluyen pero no están limitadas a, cepas de una especie *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (por ejemplo, cepas de serotipo O157:H7), especies de *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), especies de *Helicobacter*, (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, especies de *Vibrios* (por ejemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptococci*. Ver, por ejemplo, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3ª ed., pp. 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2ª. Ed.; pp. 239-254, Plenum Medical Book Co., Nueva York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ª. Ed., Churchill Livingstone, Nueva York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248:705-711 (1990).

Los compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención pueden comprender además al menos uno de cualquier auxiliar adecuado, tal como, pero no limitado, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, solventes lipofílicos, conservantes, adyuvantes o similares. Los auxiliares farmacéuticamente aceptables son preferidos. Los ejemplos no limitantes de, y métodos de preparación de tales soluciones estériles son bien conocidos en la técnica, tal como, pero no limitados a Gennaro. Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Los soportes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar rutinariamente que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad de la composición del anticuerpo anti-IL-12 como es bien sabido en la técnica o como se describe aquí.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen pero no están limitados a, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcares), que pueden estar presentes de forma individual o en combinación, comprendiendo solo o en combinación del 1-99,99% en peso o volumen. Los excipientes proteicos de ejemplo incluyen seroalbúmina tal como seroalbúmina humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Aminoácidos/componentes de anticuerpo representativos, que también pueden funcionar en capacidad amortiguadora, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Un aminoácido preferido es glicina.

Los excipientes de hidratos de carbono adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos tal como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tal como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tal como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucidol), mioinositol y similares. Los excipientes de hidratos de carbono preferidos para su uso en la presente invención son manitol, trehalosa, y rafinosa.

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 también pueden incluir un tampón o un agente para ajustar el pH; típicamente, el tampón es una sal preparada de un ácido orgánico o una base. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tal como sales de ácido cítrico, ácidos ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; tampones Tris, clorhidrato de trometamina o fosfato. Los

tampones preferidos para su uso en la presente invención son sales de ácidos orgánicos tales como citrato.

Además, las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, agentes tensoactivos (por ejemplo, polisorbatos, tal como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Estos y excipientes y/o aditivos farmacéuticos adicionales conocidos adecuados para su uso en las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 según la invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales de soporte o excipiente preferidos son hidratos de carbono (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

Formulaciones

Como se ha observado anteriormente, la invención proporciona formulaciones estables, que es preferiblemente un tampón fosfato con solución salina o una sal elegida, así como soluciones conservadas y formulaciones que contienen un conservante así como formulaciones multiuso conservadas adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un anticuerpo anti-IL-12 en una formulación farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones conservadas contienen al menos un conservante conocido u opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercurio, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Se puede usar cualquier concentración o mezcla adecuada como se sabe en la técnica, tal como 0,001-5% o cualquier intervalo o valor dentro del mismo, tal como, pero no limitado a 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Ejemplos no limitantes incluyen, sin conservante, m-cresol al 0,1-2% (por ejemplo, al 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), alcohol bencílico al 0,1-3% (por ejemplo, al 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%) timerosal al 0,001-0,5% (por ejemplo, al 0,005, 0,01), fenol al 0,001-2,0% (por ejemplo, al 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), alquilparabeno(s) al 0,0005-1,0% (por ejemplo, al 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%), y similares.

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un artículo de fabricación, que comprende material de empaquetamiento y al menos un vial que comprende una solución de al menos un anticuerpo anti-IL-12 con las tampones y/o conservantes prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en donde dicho material de empaquetamiento comprende una etiqueta que indica que tal solución se puede mantener durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más. La invención comprende además un artículo de fabricación, que comprende material de empaquetamiento, un primer vial que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso de tampón o conservante prescrito, en donde dicho material de empaquetamiento comprende una etiqueta que instruye a un paciente a reconstituir el al menos un anticuerpo anti-IL-12 en el diluyente acuoso para formar una solución que se puede mantener durante un periodo de veinticuatro horas o más.

El al menos un anticuerpo anti-IL-12 usado según la presente invención se puede producir por medios recombinantes, incluyendo a partir de células de mamíferos o preparaciones transgénicas, o se puede purificar de otras fuentes biológicas, como se describe aquí o como se sabe en la técnica.

El intervalo del al menos un anticuerpo anti-IL-12 en el producto de la presente invención incluye cantidades que producen tras la reconstitución, si es en un sistema húmedo/seco, concentraciones desde alrededor de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ hasta alrededor de 1000 mg/ml, aunque concentraciones menores y mayores son operativas y dependen del vehículo de administración deseado, por ejemplo, las formulaciones en solución serán diferentes de los parches transdérmicos, métodos pulmonares, transmucosa, o bombas osmóticas o microbombas.

Preferiblemente, el diluyente acuoso opcionalmente comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferidos incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservante usado en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto anti-microbiano. Tales concentraciones dependen del conservante seleccionado y se determinan fácilmente por el experto en la materia.

Se pueden añadir opcionalmente y preferiblemente al diluyente otros excipientes, por ejemplo, agentes de

isotonicidad, tampones, antioxidantes, potenciadores de conservantes. Un agente de isotonicidad, tal como glicerina, se usa normalmente a concentraciones conocidas. Preferiblemente se añade un tampón fisiológicamente tolerado para proporcionar un control del pH mejorado. Las formulaciones pueden cubrir un amplio rango de pH, tal como desde alrededor de pH 4 hasta alrededor de pH 10, y rangos preferidos desde alrededor de pH 5 hasta alrededor de pH 9, y un rango más preferido de alrededor de 6,0 hasta alrededor de 8,0. Preferiblemente las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,8. Los tampones preferidos incluyen tampones fosfato, lo más preferiblemente fosfato de sodio, particularmente solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Opcionalmente se pueden añadir a las formulaciones o composiciones otros aditivos, tal como un solubilizante farmacéuticamente aceptable como Tween 20 (monolaurato sorbitano de polioxietileno (20)), Tween 40 (monopalmitato sorbitano de polioxietileno (20)), Tween 80 (monooleato sorbitano de polioxietileno (20)), Pluronic F68 (copolímeros en bloque de polioxietileno y polioxipropileno), y PEG (polietilenglicol) o agentes tensoactivos no iónicos tales como polisorbato 20 ó 80 o poloxámero 184 ó 188, polioles Pluronic®, otros copolímeros en bloque, y agentes quelantes tales como EDTA y EGTA para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa una bomba o envase de plástico para administrar la formulación. La presencia de agentes tensoactivos farmacéuticamente aceptables mitiga la precipitación de las proteínas a agregar.

Las formulaciones de la presente divulgación se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-IL-12 y un conservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla del al menos un anticuerpo anti-IL-12 y conservante en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando procedimientos convencionales de disolución y mezcla. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo anti-IL-12 en solución tamponada con el conservante deseado en una solución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante en las concentraciones deseadas. El experto en la materia reconocería variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración usados.

Las formulaciones reivindicadas se pueden suministrar a pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que comprende agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente un tampón fosfato y/o solución salina y una sal elegida, en un diluyente acuoso. Bien un vial de una solución individual o un vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento del paciente y de esta manera puede proporcionar una pauta de tratamiento más conveniente que las actualmente disponible.

Los presentes artículos de fabricación reivindicados son útiles para la administración durante un periodo de inmediatamente a veinticuatro horas o más. Según esto, los artículos de fabricación ahora reivindicados ofrecen ventajas significativas al paciente. Las formulaciones de la divulgación opcionalmente se pueden almacenar de forma segura a temperaturas desde alrededor de 2 hasta alrededor de 40°C y mantienen la actividad biológica de la proteína durante periodos de tiempo extensos, de esta manera, permiten una etiqueta de empaquetamiento que indica que la solución se puede mantener y/o usar durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, ó 96 horas o más. Si se usa diluyente conservado, tal etiqueta puede incluir el uso hasta 1-12 meses, medio año, uno y medio y/o dos.

Las soluciones de al menos un anticuerpo anti-IL-12 en la invención se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La mezcla se lleva a cabo usando procedimientos convencionales de disolución y mezcla. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y opcionalmente un conservante o tampón a las concentraciones deseadas. El experto en la materia reconocería variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración usados.

Los productos reivindicados se pueden suministrar a pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial del al menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que comprende el diluyente acuoso. Bien un vial de una solución individual o un vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento de paciente y de esta manera puede proporcionar una pauta de tratamiento más conveniente que las actualmente disponible.

Los productos reivindicados se pueden suministrar indirectamente a pacientes proporcionando a farmacias, clínicas, u otras instituciones e instalaciones, soluciones transparentes o viales duales que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso.

La solución transparente en este caso puede ser de hasta un litro o incluso mayor en tamaño, proporcionando una gran reserva de la que se pueden retirar partes más pequeñas de la solución del al menos un anticuerpo una o múltiples veces para su transferencia a viales más pequeños y ser suministrada por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

5

Los dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de viales individuales incluyen aquellos dispositivos de inyector de pluma para la administración de una solución tal como BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®] NovoPen[®], B-D[®]Pen, AutoPen[®], y OptiPen[®], GenotropinPen[®]; Genotronorm Pen[®], Humatro Pen[®], Reco-Pen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], por ejemplo fabricados o desarrollados por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suiza, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregón (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de viales dual incluyen aquellos sistemas de inyector de pluma para reconstitución de un fármaco liofilizado en un cartucho para administración de la solución reconstituida tal como HumatroPen[®].

10

15

Los productos ahora reivindicados incluyen material de empaquetamiento. El material de empaquetamiento proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en que el producto se puede usar. El material de empaquetamiento de la presente divulgación proporciona instrucciones al paciente para reconstituir el al menos un anticuerpo anti-IL-12 en el diluyente acuoso para formar una solución y para usar la solución durante un periodo de 2-24 horas o mayor para el producto en dos viales, húmedo/seco. Para el vial individual, el producto en solución, la etiqueta indica que tal solución se puede usar durante un periodo de 2-24 horas o mayor. Los productos ahora reivindicados son útiles para uso de producto farmacéutico en seres humanos.

20

Las formulaciones de la presente divulgación se pueden preparar mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-IL-12 y un tampón seleccionado, preferiblemente un tampón fosfato que contiene solución salina o una sal elegida. La mezcla del al menos un anticuerpo anti-IL-12 y tampón en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando procedimientos convencionales de disolución y mezcla. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo anti-IL-12 en agua o tampón con el agente tamponante en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el tampón en las concentraciones deseadas. El experto en la materia reconocerá variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración usados.

25

30

Las formulaciones estables o conservadas reivindicadas se pueden suministrar a pacientes como soluciones transparentes o como viales duales que comprenden un vial de al menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado que se reconstituye con un segundo vial que comprende un conservante o tampón y excipientes en un diluyente acuoso. Bien un vial de una solución individual o un vial dual que requiere reconstitución se pueden reutilizar múltiples veces y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento de paciente y de esta manera puede proporcionar una pauta de tratamiento más conveniente que las actualmente disponibles.

35

40

Se puede administrar a un paciente al menos un anticuerpo anti-IL-12 en las formulaciones o soluciones estables o conservadas descritas aquí según la presente divulgación a través de una variedad de métodos de distribución incluyendo inyección SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosa, implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba, u otros medios que aprecia el experto en la materia, como es bien sabido en la técnica.

45

Aplicaciones terapéuticas

El anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo divulgado en la presente puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad inmune, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero no limitada a, al menos uno de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide sistémica de inicio juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, artrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/ granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, orquitis/procedimientos reversos de vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis de contacto alérgica, conjuntivitis alérgica, neumonitis hipersensible, trasplantes, rechazo al trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra el huésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome séptico, septicemia por gram positivos, septicemia por gram negativos, septicemia de cultivo negativo, septicemia fúngica, fiebre neutropénica, urosepticemia, meningococcemia, traumatismo/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia falciforme, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones hipersensibles, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxia sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo a trasplante de riñón, rechazo al trasplante de corazón, rechazo al trasplante de hígado, rechazo al trasplante de páncreas, rechazo al trasplante de pulmón, rechazo al trasplante de médula ósea

50

55

60

65

(BMT), rechazo a aloinjerto de piel, rechazo al trasplante de cartilago, rechazo al injerto de hueso, rechazo al trasplante de intestino delgado, rechazo al implante de timo fetal, rechazo al trasplante de paratiroides, rechazo a xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes resistente a insulina de tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidad mediada por anticuerpo, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal y síndrome de cambios en la piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, síndrome de cambios en la piel, síndrome antifosfolípido, pénfigo, escleroderma, enfermedad mezclada de tejido conjuntivo, enfermedad idiopática de Addison, diabetes melitus, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiectomía post-IM, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debido a organismos intracelulares, sensibilidad a fármacos, metabólico/idiopático, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, deficiencia en alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomielitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad del pulmón neonatal crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), linfocitosis hematofagocítica familiar, afecciones dermatológicas, soriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, terapia okt3, terapia anti-cd3, terapia de citoquina, quimioterapia, terapia de radiación (por ejemplo, incluyendo, pero no limitada a astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación de salicilato crónica, y similares. Ver, por ejemplo, The Merck Manual, 12^a-17^a ediciones, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Segunda edición, Appleton y Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

El anticuerpo o porción que se une al antígeno divulgado en la presente puede ser para modular o tratar al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo pero no limitado a, síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad aterosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, shock, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos ectópicos auriculares, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome post perfusión, respuesta a la inflamación bypass cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia QRS estrecha regular, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias de His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo de rama, trastornos isquémicos miocárdicos, enfermedad arterial coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, miocardiopatía dilatada miocardiopatía congestiva, miocardiopatía restrictiva, cardiopatías valvulares, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad periférica aterosclerótica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas varicosas, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome posterior a la bomba, lesión por isquemia-reperfusión y similares. Dicho método puede comprender opcionalmente administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente.

La presente divulgación también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente.

El anticuerpo o porción que se une al antígeno del mismo divulgado en la presente se puede administrar antes, al mismo tiempo, y/o después de al menos uno seleccionado de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo contra TNF o fragmento, un receptor soluble de TNF o fragmento, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofín, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio y oro, sulfato de hidroxycloquina, leflunomida, sulfasalicina), un relajante muscular, un narcótico, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasítico, un antivírico, un carbapenemo, cefalosporina, una fluroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutriente, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusígeno, un antiemético, un antiúlcera, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de remplazo hormonal, un modulador de receptor de estrógeno, midriático, un ciclopléxico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación contra el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Ver por ejemplo, Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2^a Edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Edición Deluxe, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA

(2000).

Los antagonistas de TNF adecuados para la presente invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y moléculas de receptor que se unen específicamente a TNF; compuestos que previenen y/o inhiben la síntesis de TNF, la liberación de TNF o su acción en células diana, tal como talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de adenosina A2b y potenciadores del receptor de adenosina A2b; compuestos que previenen y/o inhiben la señalización del receptor de TNF, tal como los inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben el corte de TNF de membrana, tal como los inhibidores de metaloproteinasas; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad de TNF, tal como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o síntesis de TNF, tal como inhibidores de la MAP quinasa.

Como se usa aquí, un "anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral", "anticuerpo contra TNF", "anticuerpo de TNF", o fragmento y similares disminuye, bloquea, inhibe, abroga o interfiere con la actividad de TNF *in vitro*, *in situ* y/o preferiblemente *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo humano contra TNF adecuado de la presente invención se puede unir a TNF α e incluye anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y mutantes o dominios especificados de los mismos que se unen específicamente a TNF α . Un anticuerpo o fragmento contra TNF adecuado también puede disminuir, bloquear, abrogar, interferir, prevenir y/o inhibir la síntesis de ARN, ADN o proteína TNF, la liberación de TNF, la señalización del receptor de TNF, el corte de TNF de membrana, la actividad de TNF, la producción y/o síntesis de TNF.

El anticuerpo quimérico cA2 consiste en la región variable de unión al antígeno del anticuerpo de ratón neutralizante de alta afinidad IgG1 anti-TNF α humano, designado A2, y las regiones constantes de una inmunoglobulina kappa IgG1 humana. La región Fc de IgG1 humana mejora la función efectora del anticuerpo alogénico, aumenta la vida media circulante en suero y disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo. La avidéz y especificidad del anticuerpo quimérico cA2 deriva de la región variable del anticuerpo murino A2. En una forma de realización particular, una fuente preferida de ácidos nucleicos que codifican la región variable del anticuerpo murino A2 es la línea celular de hibridoma A2.

A2 quimérico (cA2) neutraliza el efecto citotóxico tanto del TNF α humano natural como recombinante en una manera dependiente de la dosis. De los ensayos de unión del anticuerpo quimérico cA2 y TNF α humano recombinante, se calculó que la constante de afinidad del anticuerpo quimérico era de $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Los métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad del anticuerpo monoclonal mediante inhibición competitiva se pueden encontrar en Harlow, *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988; Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, Nueva York, (1992-2000); Kozbor *et al.*, *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York (1987-2000); y Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983).

En una forma de realización particular, el anticuerpo monoclonal murino A2 es producido por una línea celular designada c134A. El anticuerpo quimérico cA2 es producido por una línea celular designada c168A.

Ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales anti-TNF que se pueden usar en la presente invención se describen en la técnica (ver por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5231024; Möller, A. *et al.*, *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); Solicitud de EE.UU. No. 07/943852 (presentada el 11 de septiembre 1992); Rathjen *et al.*, Publicación Internacional No. WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991); Rubin *et al.*, publicación de patente EPO No. 0 218 868 (publicada el 22 de abril de 1987), Yone *et al.*, Publicación de Patente EPO No. 0 288 088 (26 de octubre de 1988); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager, *et al.*, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); y Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987).

Moléculas de receptor de TNF

Las moléculas de receptor de TNF preferidas útiles en la presente invención son aquellas que se unen a TNF con gran afinidad (ver, por ejemplo, Feldmann *et al.*, publicación Internacional No. WO 92/07076 (publicada el 30 abril de 1992); Schall *et al.*, *Cell* 61:361-370 (1990); y Loetscher *et al.*, *Cell* 61:351-359 (1990) y opcionalmente poseen baja inmunogenicidad. En particular, los receptores de TNF de la superficie celular de 55 kDa (p55 TNF-R) y de 75 kDa (p75 TNF-R) son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelular (ECD) de los receptores o partes funcionales de los mismos (ver, por ejemplo, Corcoran *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), también son útiles en la presente invención. Las formas truncadas de los receptores de TNF, que comprenden el ECD, se han detectado en orina y suero como proteínas inhibitoras de unión a TNF de 30 y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Las moléculas multiméricas de receptor de TNF y las moléculas inmunorreceptoras de fusión de TNF, y derivados y fragmentos o partes de las mismas, son ejemplos adicionales de moléculas de receptor de TNF que son útiles en los métodos y composiciones

de la presente invención. Las moléculas de receptor de TNF que se pueden usar en la invención se caracterizan por su capacidad para tratar pacientes durante periodos extensos con mejora de síntomas de buena a excelente y baja toxicidad. La baja inmunogenicidad y/o alta afinidad, así como otras propiedades no definidas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos alcanzados.

5

Las moléculas multiméricas de receptor de TNF útiles en la presente invención comprenden todo o una parte funcional del ECD de dos o más receptores de TNF unidos a través de uno o más enlazadores polipeptídicos u otros enlazadores no peptídicos, tal como polietilenglicol (PEG). Las moléculas multiméricas pueden comprender además un péptido señal de una proteína secretada para dirigir la expresión de la molécula multimérica. Estas moléculas multiméricas y los métodos para su producción se han descrito en La solicitud de EE.UU. No. 08/437533 (presentada el 9 de mayo de 1995).

10

Las moléculas inmunorreceptoras de fusión de TNF útiles en la presente invención comprenden al menos una parte de una o más moléculas de inmunoglobulina y todo o una parte funcional de uno o más receptores de TNF. Estas moléculas inmunorreceptoras de fusión se pueden ensamblar como monómeros, o hetero- u homo-multímeros. Las moléculas inmunorreceptoras de fusión también pueden ser monovalentes o multivalentes. Un ejemplo de tales moléculas inmunorreceptoras de fusión es la proteína de fusión receptor de TNF/IgG. Las moléculas inmunorreceptoras de fusión de TNF y los métodos para su producción se han descrito en la técnica (Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994); Butler *et al.*, *Cytokine* 6(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, patente de EE.UU. No. 5447851; y solicitud de EE.UU. No. 08/442133 (presentada el 16 de mayo de 1995). También se pueden encontrar métodos para producir moléculas inmunorreceptoras de fusión en Capon *et al.*, patente de EE.UU. No. 5116964; Capon *et al.*, patente de EE.UU. No. 5225538; y Capon *et al.*, *Nature* 337:525-531(1989).

15

20

25

Un equivalente funcional, derivado, fragmento o región de la molécula del receptor de TNF se refiere a la parte de la molécula del receptor de TNF, o la parte de la secuencia de la molécula del receptor de TNF que codifica una molécula de receptor de TNF, que es de tamaño y secuencias suficientes para parecerse funcionalmente a moléculas del receptor de TNF que se pueden usar en la presente invención (por ejemplo, se une a TNF con gran afinidad y posee baja inmunogenicidad). Un equivalente funcional de la molécula del receptor de TNF también incluye moléculas modificadas del receptor de TNF que se parecen funcionalmente a las moléculas del receptor de TNF que se pueden usar en la presente invención (por ejemplo, se une a TNF con gran afinidad y posee baja inmunogenicidad). Por ejemplo, un equivalente funcional de una molécula de receptor de TNF puede contener un codón "SILENCIOSO" o una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos (por ejemplo, sustitución de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido; o sustitución de un codón que codifica un aminoácido hidrofóbico igual o diferente por otro codón que codifica un aminoácido hidrofóbico). Ver, Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, Nueva York (1987-2000).

30

35

Las citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Ver, por ejemplo, www.CopewithCytokines.com. Los antagonistas de citoquinas incluyen, pero no están limitados a, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier receptor soluble, fragmento o mimético, cualquier antagonista de molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos.

40

Tratamientos terapéuticos. El anticuerpo o composición de la invención se puede usar en un método para tratar un trastorno mediado por IL-12, que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o composición a una célula, tejido, órgano, animal o paciente en necesidad. Tal método puede opcionalmente comprender además la coadministración o terapia de combinación para tratar tales enfermedades inmunes, en donde la administración de dicho anticuerpo o composición comprende además administrar, antes, al mismo tiempo, y/o después, al menos uno seleccionado de al menos uno de al menos uno seleccionado de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo contra TNF o fragmento, un receptor soluble de TNF o fragmento, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofín, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio y oro, sulfato de hidroxicloraquina, leflunomida, sulfasalicina), un relajante muscular, un narcótico, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasítico, un antivírico, un carbapenemo, cefalosporina, una fluroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutritivo, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusígeno, un antiemético, un antiúlceras, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un modulador de receptor de estrógeno, midriático, un ciclopléxico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, una medicación contra el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornasa alfa

45

50

55

60

65

(Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina.

Típicamente, el tratamiento de afecciones patológicas se efectúa administrando una cantidad o dosis eficaz de al menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 que totaliza, de media, un intervalo de al menos alrededor de 0,01 hasta 500 miligramos de al menos un anticuerpo anti-IL-12 por kilo de paciente por dosis, y preferiblemente desde al menos alrededor de 0,1 a 100 miligramos de anticuerpo/kilo de paciente por administración individual o múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. De forma alternativa, la concentración eficaz en suero puede comprender 0,1-5000 µg/ml de concentración en suero por administración individual o múltiple. Las dosis adecuadas son conocidas para los médicos y, por supuesto, dependerán del estado particular de la enfermedad, la actividad específica de la composición que se administra, y el paciente particular que se somete a tratamiento. En algunos casos, para alcanzar la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis controlada o medida particular, donde las administraciones individuales se repiten hasta alcanzar la dosis diaria o efecto deseado.

Las dosis preferidas pueden incluir opcionalmente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de las mismas, o para alcanzar una concentración en suero de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, y/o 5000 µg/ml de concentración en suero por administración individual o múltiple, o cualquier intervalo, valor o fracción de las mismas.

De forma alternativa, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tal como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; edad, salud y peso del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Normalmente una dosis de principio activo puede ser alrededor de 0,1 a 10 mg por kilogramo de peso corporal. Normalmente de 0,1 a 50, y preferiblemente de 0,1 a 10 mg por kilo por administración o en forma de liberación sostenida es eficaz para obtener los resultados deseados.

Como ejemplo no limitante, se puede proporcionar el tratamiento de seres humanos o animales como una dosis de una vez o periódica de al menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/kg, por día, en al menos un día del día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ó 40, o de forma alternativa o adicional, al menos una de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, ó 52, o de forma alternativa o adicional, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 años, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis individuales, infusión o repetidas.

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna generalmente contienen desde alrededor de 0,1 miligramo hasta alrededor de 500 miligramos de principio activo por unidad o envase. En estas composiciones farmacéuticas el principio activo normalmente estará presente en una cantidad desde el 0,5-99,999% en peso basado en el peso total de la composición.

Para la administración parenteral, el anticuerpo se puede formular como una solución, suspensión, emulsión, o polvo liofilizado en asociación, o suministrados de forma separada, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y seroalbúmina humana al 1-10%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tal como aceites no volátiles. El vehículo o polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La solución se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Los soportes farmacéuticos adecuados se describen en las ediciones más recientes de Remington's Pharmaceutical Science, A. Osol, un texto estándar de referencia en este campo.

Administración alternativa

Se pueden usar muchos modos conocidos y desarrollados según la presente invención para administrar cantidades farmacéuticamente eficaces de al menos un anticuerpo anti-IL-12 según la presente invención. Mientras que se usa la administración pulmonar en la siguiente descripción, se pueden usar otros modos de administración

según la presente invención con resultados adecuados.

Los anticuerpos de IL-12 de la presente invención se pueden distribuir en un soporte, como una solución, emulsión, coloide o suspensión, o como un polvo seco, usando cualquiera de una variedad de dispositivos y métodos adecuados para la administración mediante inhalación u otros modos descritos aquí o conocidos en la técnica.

Formulaciones y administración parenteral

Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua o solución salina estéril, polialquilenglicoles tal como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las soluciones acuosas u oleaginosas para inyección se pueden preparar usando un emulsionante o humectante apropiado y un agente suspensor, según métodos conocidos. Los agentes para la inyección pueden ser un agente diluyente no tóxico no oralmente administrable tal como una solución acuosa o una solución o suspensión inyectable estéril en un solvente. Como vehículo o solvente utilizable, se permiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como solvente normal, o solvente de suspensión, se puede usar un aceite no volátil estéril. Para estos fines, se puede usar cualquier tipo de aceite y ácido graso no volátil, incluyendo aceites grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos; mono- o di- o tri-glicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero no está limitada, medios de inyección convencionales, un dispositivo de inyección sin aguja con gas presurizado como se describe en la patente de EE.UU. No. 5851198, y un dispositivo perforador por láser como se describe en la patente de EE.UU. No. 5839446.

Distribución alternativa

La invención se refiere además a la administración de al menos un anticuerpo anti-IL-12 por medio parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intraceliaco, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, intranasal, o transdérmico. Se puede preparar al menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 para su uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otra administración particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para su uso en administración vaginal o rectal particularmente en formas semisólidas tal como, pero no limitadas a, cremas y supositorios; para administración oral o yugal tal como, pero no limitadas a, en forma de comprimidos o cápsulas; o por vía intranasal tal como, pero no limitado a, la forma de polvo, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o por vía transdérmica tal como pero no limitado a un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de distribución de parche con potenciadores químicos tal como dimetilsulfóxido para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración de fármaco en el parche transdérmico (Junginger, et al. En "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. Nueva York 1994), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (WO 98/53847), o la aplicación de campos eléctricos para crear vías transitorias de transporte tal como electroporación, o para aumentar la motilidad de fármacos cargados a través de la piel tal como iontoforesis, o la aplicación de ultrasonido tal como sonoforesis (patentes de EE.UU. Nos. 4309989 y 4767402).

Administración pulmonar/nasal

Para la administración pulmonar, preferiblemente se distribuye al menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 en un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias bajas del pulmón o senos. Según la invención, se puede distribuir al menos un anticuerpo anti-IL-12 mediante cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación o nasales conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico mediante inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar formulaciones en aerosol en la cavidad sinusal o alveolos de un paciente incluyen inhaladores de dosis medidas, nebulizadores, generadores de polvo seco, aerosoles y similares. Otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos también son conocidos en la técnica. Todos esos dispositivos pueden hacer uso de formulaciones adecuadas para la administración para dispensar anticuerpos en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar comprendidos en soluciones (tanto acuosas como no acuosas) o partículas sólidas. Los inhalador de dosis medidas, como el inhalador de dosis medida Ventolin[®], típicamente usan un gas propelente y requieren actuación durante la inspiración (ver, por ejemplo, WO 94/16970, WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler[™] (Astra), Rotahaler[®] (Glaxo), Diskus[®] (Glaxo), inhalador Spiros[™] (Dora), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador en polvo Spinhaler[®] (Fisons), usan respiración-actuación de un polvo mezclado (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como AERx[™] Aradigm, el nebulizador Ultravent[®] (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II[®] (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), las referencias anteriores enteramente incorporadas aquí mediante referencia, producen aerosoles de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medidas, inhaladores de polvo seco, etc., generan aerosoles de partícula pequeña. Estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comercialmente disponibles se pretende que sean una representación de dispositivos específicos adecuados para la práctica de esta invención, y no se pretenden como limitantes del ámbito de la invención. Preferiblemente, se distribuye una composición que comprende

al menos un anticuerpo anti-IL-12 mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay varias características deseables de un dispositivo de inhalación para administrar al menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la distribución por el dispositivo de inhalación es de forma ventajosa fiable, reproducible y exacta. El dispositivo de inhalación puede distribuir opcionalmente partículas secas pequeñas, por ejemplo, de menos de
5 alrededor de 10 μm , preferiblemente de alrededor de 1-5 μm , para una buena respirabilidad.

Administración de composiciones de anticuerpo anti-IL-12 como un aerosol

Se puede producir un aerosol que incluya una composición proteica de anticuerpo IL-12 forzando una
10 suspensión o solución de al menos un anticuerpo anti-IL-12 a través de una boquilla a presión. El tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada, y la velocidad de alimentación del líquido se pueden elegir para alcanzar la emisión y tamaño de partícula deseados. Se puede producir un electrospray, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en unión con un capilar o boquilla de alimentación. De forma ventajosa, las partículas de la proteína de composición de al menos un anticuerpo anti-IL-12 distribuidas mediante un pulverizador tienen un tamaño de
15 partícula de menos de alrededor de 10 μm , preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1 μm hasta alrededor de 5 μm , y lo más preferiblemente alrededor de 2 μm hasta alrededor de 3 μm .

Las formulaciones de composición proteica de al menos un anticuerpo anti-IL-12 adecuadas para su uso con
20 un pulverizador típicamente incluyen composición proteica de anticuerpo en un solución acuosa a una concentración de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 100 mg de una composición proteica de al menos un anticuerpo anti-IL-12 por ml de solución o mg/gm, o cualquier rango o valor dentro de la misma, por ejemplo, pero no limitado a, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/ml ó mg/gm. La formulación puede incluir agentes tal como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un agente tensoactivo, y, preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la proteína de la composición de anticuerpo, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de masa, o un hidrato de carbono. Las proteínas de masa útiles en la formulación de las proteínas de composición de anticuerpo incluyen albúmina, protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en formular las proteínas de composición de anticuerpo incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de la proteína de la composición de anticuerpo también puede incluir un agente tensoactivo, que puede reducir o prevenir agregación inducida por la superficie de la proteína de la composición de anticuerpo producida por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear varios agentes tensoactivos convencionales, tales como ésteres de ácidos grasos y polioxietileno y alcoholes, y ésteres sorbitoles de ácidos grasos y polioxietileno. Las cantidades generalmente variarán entre el 0,001 y el 14% en peso de la formulación. Agentes tensoactivos especialmente preferidos para los fines de esta invención son monooleato sorbitano de polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También se pueden incluir agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como anticuerpos anti-IL-12, o partes especificadas o variantes en la formulación.
35

Administración de composiciones de anticuerpo anti-IL-12 mediante un nebulizador

Se puede administrar la composición proteica de anticuerpo mediante un nebulizador, tal como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Típicamente, en un nebulizador de chorro se usa una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire de gran velocidad a través de un orificio. Cuando el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de baja presión, que arrastra la solución de proteína de la composición de anticuerpo a través de un tubo capilar unido a depósito de líquido. La corriente de líquido desde el tubo capilar se rompe en filamentos y gotas inestables según sale del tubo, creando el aerosol. Se pueden emplear un rango de configuraciones, velocidades de flujo, y tipos de separadores para alcanzar las características de realización deseadas de un nebulizador a chorro determinado. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía vibratoria, mecánica, típicamente empleando un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de la proteína de la composición de anticuerpo directamente o través de un líquido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la proteína de la composición de anticuerpo. De forma ventajosa, las partículas de la proteína de la composición de anticuerpo distribuidas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula de menos de alrededor de 10 μm , preferiblemente en el intervalo de alrededor de 1 μm hasta alrededor de 5 μm , y lo más preferiblemente alrededor de 2 μm hasta alrededor de 3 μm .
40
45
50

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-IL-12 adecuadas para su uso con un nebulizador, de chorro o ultrasónico, típicamente incluyen una concentración de alrededor de 0,1 mg hasta alrededor de 100 mg de la proteína de al menos un anticuerpo anti-IL-12 por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tal como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un agente tensoactivo, y, preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la proteína de la composición de al menos un anticuerpo anti-IL-12, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de masa, o un hidrato de carbono. Las proteínas de masa útiles en la formulación de las proteínas de composición de anticuerpo incluyen albúmina, protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en formular al menos un anticuerpo anti-IL-12 incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de al menos un anticuerpo anti-IL-12 también puede incluir un agente tensoactivo, que puede reducir o prevenir agregación inducida por la superficie de
55
60
65

al menos un anticuerpo anti-IL-12 producida por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear varios agentes tensoactivos convencionales, tal como ésteres de ácidos grasos y polioxietileno y alcoholes, y ésteres sorbitoles de ácidos grasos y polioxietileno. Las cantidades generalmente variarán entre el 0,001 y el 4% en peso de la formulación. Agentes tensoactivos especialmente preferidos para los fines de esta invención son monooleato sorbitano de polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También se pueden incluir agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como una proteína de anticuerpo en la formulación.

Administración de composiciones de anticuerpo anti-IL-12 mediante un inhalador de dosis medidas

En un inhalador de dosis medidas (MDI), un propulsor, al menos un anticuerpo anti-IL-12, y cualquier excipiente u otros aditivos, están contenidos en un bote como una mezcla incluyendo un gas comprimido licuado. La actuación de la válvula de medida libera la mezcla como un aerosol, preferiblemente conteniendo partículas en el intervalo de tamaño de menos de alrededor de 10 μm , preferiblemente de alrededor de 1 μm hasta alrededor de 5 μm , y lo más preferiblemente alrededor de 2 μm hasta alrededor de 3 μm . El tamaño de partícula de aerosol deseado se puede obtener empleando una formulación de composición proteica de anticuerpo producida por varios métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo micronización, secado por rociado, condensación a punto crítico, o similares. Los inhaladores de dosis medidas preferidos incluyen los fabricados por 3M o Glaxo y que emplean propulsor de hidrofluorocarbono.

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-IL-12 para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medidas generalmente incluirán un polvo finamente dividido que contendrá al menos un anticuerpo anti-IL-12 como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo suspendido en un propulsor con ayuda de un agente tensoactivo. El propulsor puede ser de cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorefluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrodrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrodrofluoroalcano-227), o similares. Preferiblemente, el propulsor es un hidrofluorocarbono. Se puede elegir el agente tensoactivo para estabilizar el al menos un anticuerpo anti-IL-12 como una suspensión en el propulsor, para proteger el principio activo contra la degradación química, y similares. Los agentes tensoactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitano, lecitina de soja, ácido oleico, o similares. En algunos casos se prefieren aerosoles que usan solventes tal como etanol. También se pueden incluir agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como una proteína en la formulación.

El experto en la materia reconocerá que los métodos de la presente invención se pueden alcanzar mediante administración pulmonar de composiciones de al menos un anticuerpo anti-IL-12 a través de dispositivos no descritos aquí.

Formulaciones y administración oral

Las formulaciones orales se basan en la coadministración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y agentes tensoactivos no iónicos tal como polioxietileno oleil éter y n-hexadecilpolietileno éter) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. El compuesto constituyente activo de la forma farmacéutica de tipo sólido para la administración oral se puede mezclar con al menos un aditivo, incluyendo sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, arginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semisintéticos, y glicéridos. Estas formas farmacéuticas también pueden contener otro(s) tipo(s) de aditivos, por ejemplo, agente diluyente inactivo, lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, agente conservante tal como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidante tal como cisteína, desintegrador, aglutinante, espesante, agente amortiguador, agente edulcorante, agente saborizante, agente perfumante, etc.

Los comprimidos y píldoras se pueden procesar adicionalmente en preparaciones entéricas recubiertas. Las preparaciones líquidas para la administración oral incluyen preparaciones en emulsión, jarabe, elixir, suspensión y solución permisible para uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos normalmente usados en dicho campo, por ejemplo, agua. También se han descrito liposomas como sistemas de distribución de fármacos para insulina y heparina (patente de EE.UU. No. 4239754). Más recientemente, se han usado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mezclados (proteinoideas) para distribuir productos farmacéuticos (patente de EE.UU. No. 4925673). Además, se usan compuestos soporte descritos en la patente de EE.UU. No. 5879681 y la patente de EE.UU. No. 55871753 para distribuir agentes biológicamente activos por vía oral son conocidos en la técnica.

Formulaciones y administración por mucosa

Para la absorción a través de las superficies de la mucosa, las composiciones y métodos de administrar al

menos un anticuerpo anti-IL-12 incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas submicrónicas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo, y una fase acuosa continua, que fomentan la absorción a través de las superficies de mucosas alcanzado la mucoadhesión de las partículas en emulsión (patente de EE.UU. No. 5514670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones de la presente invención pueden incluir vías de administración corneal, conjuntiva, yugal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilenglicoles, vaselina, manteca de cacao, y similares. Las formulaciones para administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas u oleaginosas de gotas nasales. Para la administración yugal los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (patente de EE.UU. No. 5849695).

Formulaciones y administración transdérmica

Para la administración transdérmica, el al menos un anticuerpo anti-IL-12 se encapsula en un dispositivo de distribución tal como un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsula o microesferas (denominadas colectivamente como micropartículas a menos que se especifique de otra manera). Se conocen un número de dispositivos adecuados, incluyendo micropartículas hechas de polímeros sintéticos tal como ácidos polihidroxi tal como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos, y polifosfacenos, y polímeros naturales tal como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y combinaciones de los mismos (patente de EE.UU. No. 5814599).

Administración y formulaciones prolongadas

Algunas veces puede ser deseable distribuir los compuestos de la presente invención al sujeto a lo largo de periodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante periodos de una semana a un año a partir de una administración única. Se pueden utilizar varias formas farmacéuticas de liberación lenta, depósito o implante. Por ejemplo, una forma farmacéutica puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los compuestos que tiene un grado bajo de solubilidad en líquidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición ácida con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutamico, ácidos naftaleno mono- o di-sulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente tal como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares o con un catión orgánico formado de por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, una sal de tanato de zinc. Además, los compuestos de la presente invención o, preferiblemente, una sal relativamente insoluble tal como las que se acaban de describir, se pueden formular en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Sales particularmente preferidas son sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato, y similares. Otro tipo de formulación en depósito de liberación lenta para inyección contendría el compuesto o sal dispersado para encapsular en un polímero no antigénico, no tóxico, de degradación lenta tal como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. No. 3773919. Los compuestos, o preferiblemente, sales relativamente insolubles tales como las descritas anteriormente también se pueden formular en pellas silásticas de matriz de colesterol, particularmente para uso en animales. En la bibliografía se conocen formulaciones adicionales de liberación lenta, depósito o implante, por ejemplo liposomas de gas o líquidos (patentes de EE.UU. No. 5770222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Habiendo descrito la invención en general, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

Se usa el vector pC4 para la expresión del anticuerpo de IL-12. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (No. de acceso de la ATCC 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Se pueden seleccionar células de ovario de hámster chino u otras que carecen de actividad dihidrofolato que se transfectan con estos plásmidos haciéndolas crecer en un medio selectivo (por ejemplo MEM alfa menos, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en células resistentes a metotrexato (MTX) está bien documentada (ver, por ejemplo, F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J.L. Hamlin y C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); y M.J. Page y M.A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)). Las células crecidas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco sobreproduciendo la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen DHFR. Si un segundo gen está unido al gen DHFR, normalmente se coamplifica y se sobreexpresa. Se sabe en la técnica que este planteamiento se puede usar para desarrollar líneas celulares que llevan más de 1000 copias del gen(es) amplificado(s). Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosoma(s) de la célula huésped.

El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) más un fragmento aislado del

potenciador del gen inmediato temprano del citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985)). En 3' del promotor hay sitios de corte de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718 que permiten la integración de los genes. Tras estos sitios de clonación el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de la preproinsulina de rata. También se pueden usar para la expresión otros promotores de alta eficacia, por ejemplo, el promotor de la b-actina humana, los promotores temprano o tardío de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV. Se pueden usar los sistemas de expresión génica de Clontech Tet-Off y Tet-On y sistemas similares para expresar IL-12 de una manera regulada en células de mamíferos (M. Gossen, y H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del ARNm se pueden usar también otras señales, por ejemplo, de los genes de la hormona de crecimiento o la globina humanas. También se pueden seleccionar líneas celulares estables que llevan un gen de interés integrado en los cromosomas tras cotransfección con un marcador de selección tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso usar más de un marcador de selección al principio, por ejemplo G418 más metotrexato.

El plásmido pC4 se digiere con enzimas de restricción y después se desfosforila usando fosfatasa de intestino de ternera mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector se aísla después de un gel de agarosa al 1%.

Se usa la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo contra IL-12 completo, por ejemplo, como se presenta en SEQ ID NOS: 7 y 8, correspondientes a las regiones variables de HC y LC de un anticuerpo contra IL-12 de la presente invención, según pasos de métodos conocidos. También se usa el ácido nucleico aislado que codifica una región constante humana adecuada (es decir regiones HC y LC) en esta construcción (por ejemplo, proporcionado en el vector p1351).

El ADN que codifica la región variable y constante aislado y el vector desfosforilado se ligan después con ADN ligasa de T4. Se transforman células de E. coli HB 101 o XL-1 Blue y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC4 usando, por ejemplo, análisis con enzimas de restricción.

Se usan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen DHFR activo para la transfección. Se contransfectan 5 g de plásmido de expresión pC4 con 0,5 g del plásmido pSV2-neo, usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador de selección dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se siembran en MEM alfa menos suplementado con G418 1 g/ml. Después de 2 días, las células se tripsinizan y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en MEM alfa menos suplementado con 10, 25 ó 50 ng/ml de metotrexato más G418 1 g/ml. Después de alrededor de 10-14 días se tripsinizan colonias individuales y después se siembran en placas petri de 6 pocillos o botellas de 10 ml usando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren después a placas nuevas de 6 pocillos que contienen concentraciones de metotrexato incluso más altas (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100-200 mM. Se analiza la expresión del producto del gen deseado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia o mediante análisis de HPLC de fase reversa.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad que reaccionan con IL-12 humana usando ratones transgénicos

Resumen

Se han usado ratones transgénicos que contienen genes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana para generar anticuerpos monoclonales de alta afinidad, completamente humanos, que se pueden usar de forma terapéutica para inhibir la acción de IL-12 para el tratamiento de una o más enfermedades mediadas por IL-12. Se inmunizan ratones híbridos (CBA/J x C57/BL6/J)_{F2} que contienen transgenes humanos de la región variable y constante de anticuerpo tanto para la cadena pesada como ligera con IL-12 humana recombinante (Taylor et al., Intl. Immunol. 6:579-591 (1993); Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996); Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)). Varias fusiones produjeron uno o más paneles de anticuerpos monoclonales IgG completamente humanos que reaccionan con IL-12. Los anticuerpos anti-IL-12 completamente humanos se caracterizan adicionalmente. Todos son IgG1. Se determina que tales anticuerpos tienen constantes de afinidad de alrededor de entre 1×10^9 y 9×10^{12} . Las afinidades inesperadamente altas de estos anticuerpos monoclonales totalmente humanos los hacen candidatos adecuados para aplicaciones terapéuticas en enfermedades, patologías o trastornos relacionados con IL-12.

Abreviaturas

BSA – seroalbúmina bovina
CO₂ – dióxido de carbono
DMSO - dimetilsulfóxido
EIA – inmunoensayo enzimático

SBF – suero bovino fetal
 H₂O₂ – peróxido de hidrógeno
 HRP – peroxidasa de rábano
 ID - intradérmico
 5 Ig - inmunoglobulina
 IL-12 - interleuquina-12
 IP - intraperitoneal
 IV - intravenoso
 Mab - anticuerpo monoclonal
 10 DO - densidad óptica
 OPD – Diclorhidrato de o-fenilenediamina
 PEG - polietilenglicol
 PSA - penicilina, estreptomina, anfotericina
 RT – temperatura ambiente
 15 SC - subcutáneo
 v/v - volumen por volumen
 p/v - peso por volumen

20 **Materiales y Métodos**

Animales

25 Los ratones transgénicos que pueden expresar anticuerpos humanos son conocidos en la técnica (y están comercialmente disponibles (por ejemplo, de GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Freemont, CA, y otros) que expresan inmunoglobulinas humanas pero no IgM o Ig de ratón. Por ejemplo, tales ratones transgénicos contienen transgenes de secuencias humanas que padecen unión V(D)J, cambio de clase de cadena pesada, y mutación somática para generar un repertorio de inmunoglobulinas de secuencia humana (Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994)). El transgén de la cadena ligera puede derivar, por ejemplo, en parte de un clon de cromosoma artificial de levadura que incluye casi la mitad de la región V de la línea germinal humana. Además, el transgén de la cadena pesada puede codificar tanto la región constante humana μ como humana 1 (Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)) y/o 3. Se pueden usar ratones derivados de linajes genotípicos apropiados en los procesos de inmunización y fusión para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra IL-12.

Inmunización

35 Se pueden usar uno o más programas de inmunización para generar los hibridomas humanos anti-IL-12. Se pueden realizar las primeras fusiones diversas según el siguiente protocolo de inmunización ejemplar, pero se pueden usar otros protocolos similares conocidos. Varios ratones transgénicos hembras y/o machos quirúrgicamente castrados de 14-20 semanas de edad se inmunizan IP y/o ID con 1-1000 μ g de IL-12 recombinante humana emulsionada con un volumen igual de TITERMAX o adyuvante completo de Freund en un volumen final de 100-400 μ L (por ejemplo, 200). Cada ratón puede recibir también opcionalmente de 1-10 μ g en 100 μ L de solución salina fisiológica en cada uno de 2 sitios SC. Los ratones se pueden inmunizar después 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 y/o 21-34 días después IP (1-400 μ g) y SC (1-400 μ g x 2) con IL-12 emulsionada con un volumen igual de TITERMAX o adyuvante incompleto de Freund. Los ratones se pueden sangrar 12-25 y 25-40 días después mediante punción retro-orbital sin anticoagulante. La sangre se deja coagular a temperatura ambiente durante una hora y se recoge y titula el suero usando un ensayo EIA de IL-12 según métodos conocidos. Se realizan las fusiones cuando las inyecciones repetidas no producen que los títulos aumenten. A este tiempo, se les puede dar a los ratones una inyección de recuerdo IV final de 1-400 μ g de IL-12 diluida en 100 μ L de solución salina fisiológica. Tres días después, los ratones se pueden sacrificar mediante dislocación cervical y recoger los bazo de forma aséptica y sumergirlos en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría que contiene penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 μ g/mL, y anfotericina B 0,25 μ g/mL (PSA). Se recogen los esplenocitos mediante perfusión estéril del bazo con PSA-PBS. Las células se lavan una vez en PSA-PBS frío, se cuentan usando exclusión del colorante azul de tripano y se resuspenden en medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM.

Fusión celular

60 La fusión se puede llevar a cabo a una proporción de 1:1 hasta 1:10 de células de mieloma murino a células viables del bazo según métodos conocidos, por ejemplo, como se sabe en la técnica. Como ejemplo no limitante, se pueden precipitar juntas las células del bazo y las células de mieloma. El precipitado se puede después resuspender lentamente, a lo largo de 30 segundos, en 1 mL de solución PEG al 50%/PBS (p/v) (peso molecular de PEG 1.450, Sigma) a 37 C. La fusión se puede detener añadiendo lentamente 10,5 mL de medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM (37 C) a lo largo de 1 minuto. Las células fusionadas se centrifugan durante 5 minutos a 500-1500 rpm. Las células se resuspenden después en medio HAT (medio RPMI 1640 que contiene Hepes 25 mM, suero fetal de clon I (Hyclon) al 10%, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 4 mM, gentamicina 10 μ g/mL, suplemento de cultivo origen (Fisher) al 2,5%, medio condicionado RPMI 1640/Hepes-653 al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, hipoxantina 100 μ M,

aminopterina 0,4 μM , y timidina 16 μM) y se siembran a 200 μL /pocillo en quince placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. Las placas se colocan en un incubador humidificado a 37 C que contiene CO_2 al 5% y aire al 95% durante 7-10 días.

5 **Detección de anticuerpos humanos IgG anti-IL-12 en suero de ratón**

Se puede usar EIA de fase sólida para cribar sueros de ratón para anticuerpos humanos IgG específicos para IL-12 humana. Brevemente, las placas se pueden recubrir con IL-12 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS durante la noche. Después de lavar en solución salina 0,15 M que contiene Tween 20 al 0,02% (v/v), los pocillos se pueden bloquear con BSA al 1% (p/v) en PBS, 200 μL /pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se usan inmediatamente o se congelan a -20 C para su uso futuro. Se incuban las diluciones del suero de ratón en las placas recubiertas de IL-12 a 50 μL /pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavan y después se ensayan con 50 μL /pocillo de IgG anti-humano de cabra marcado con HRP, específico de Fc diluido 1:30.000 en BSA al 1%-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se pueden lavar de nuevo y se añaden 100 μL /pocillo de la solución de sustrato citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio 0,2 M, H_2O_2 al 0,01% y OPD 1 mg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añade después solución de parada (ácido sulfúrico 4 N) a 25 μL /pocillo y se leen las DO a 490 nm por medio de un espectrofotómetro de placas automatizado.

20 **Detección de inmunoglobulinas completamente humanas en sobrenadantes de hibridoma**

Se pueden detectar hibridomas de crecimiento positivo que secretan inmunoglobulinas completamente humanas usando un EIA adecuado. Brevemente, se pueden recubrir placas de 96 pocillos extraíbles (VWR, 610744) con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de cabra anti-humana Fc en tampón carbonato de sodio durante la noche a 4 C. Las placas se lavan y se bloquean con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C y se usan inmediatamente o se congelan a -20 C. Se incuban los sobrenadantes de hibridoma sin diluir en placas durante una hora a 37°C. Las placas se lavan y se ensayan con kappa anti-humana de cabra marcada con HRP diluida 1:10.000 en BSA al 1% en PBS durante una hora a 37°C. Las placas se incuban después con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente.

30 **Determinación de la reactividad de anti-IL-12 completamente humano**

Los hibridomas, como anteriormente, se pueden ensayar simultáneamente para la reactividad a IL-12 usando un RIA adecuado u otro ensayo. Por ejemplo, se incuban los sobrenadantes en placas con IgG de cabra anti-humana Fc como anteriormente, se lavan y después se ensayan con IL-12 radiomarcada con cuentas por pocillo adecuadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan dos veces con PBS y se cuantifica la IL-12 radiomarcada unida usando un contador adecuado.

Los hibridomas que secretan IgG1 humana anti-IL-12 se pueden expandir en cultivo celular y subclonar serialmente mediante dilución limitante. Las poblaciones clónicas resultantes se pueden expandir y crioconservar en medio de congelación (SBF al 95%, DMSO al 5%) y almacenar en nitrógeno líquido.

40 **Isotipado**

Se puede realizar la determinación del isotipo de los anticuerpos usando un EIA en un formato similar al usado para cribar los sueros inmunes de ratón para títulos específicos. Se pueden recubrir placas de 96 pocillos con IL-12 como se ha descrito anteriormente y se puede incubar el anticuerpo purificado a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la placa durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lava y se ensaya con IgG₁ anti-humana de cabra marcada con HRP o IgG₃ anti-humana de cabra marcada con HRP diluida 1:4000 en BSA al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lava de nuevo y se incuba con solución de sustrato como se ha descrito anteriormente.

50 **Cinética de unión de anticuerpos humanos anti-IL-12 humana con IL-12 humana**

Las características de unión para anticuerpos se pueden evaluar adecuadamente usando un EIA de captura de IL-12 y tecnología BIAcore, por ejemplo. Se pueden evaluar concentraciones graduadas de anticuerpos humanos de IL-12 purificados para la unión a placas de EIA cubiertas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IL-12 en ensayos como se describe anteriormente. Se pueden presentar las DO como gráficas semi-logarítmicas que muestren las eficacias de unión relativa.

Se pueden obtener las constantes de unión cuantitativas, por ejemplo, como sigue, o mediante cualquier otro método adecuado conocido. Se coloca un chip CM-5 (carboximetil) de BIAcore en una unidad BIAcore 2000. Se hace fluir tampón HBS (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, agente tensoactivo P20 al 0,005% v/v, pH 7,4) sobre una célula de flujo del chip a 5 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ hasta que se obtiene una línea base estable. Se añade una solución (100 μL) de 15 mg de EDC (clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida) en 200 μL de agua a 100 μL de una solución de 2,3 mg de NHS (N-hidroxisuccinimida) en 200 μL de agua. Se inyectan cuarenta (40) μL de la solución resultante en el chip. Se inyectan seis μL de una solución de IL-12 humana (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetato de sodio 10 mM, pH 4,8) en el chip, produciendo un aumento de ca. 500 UR. Se cambia el tampón a tampón de carrera TBS/Ca/Mg/BSA

(Tris 20 mM, cloruro de sodio 0,15 M, cloruro de calcio 2 mM, acetato de magnesio 2 mM, Triton X-100 al 0,5%, BSA 25 µg/mL, pH 7,4) y se deja fluir sobre el chip durante la noche para equilibrarlo y para hidrolizar o bloquear cualquier éster se succinimida sin reaccionar.

5 Los anticuerpos se disuelven en el tampón de carrera a 33,33, 16,67, 8,33 y 4,17 nM. La velocidad de flujo se ajusta a 30 µL/min y la temperatura del instrumento a 25 C. Se usan dos células de flujo para las carreras de cinética, una en la que se ha inmovilizado IL-12 (muestra) y una segunda, célula de flujo sin derivar (blanco). Se inyectan 120 µL de cada concentración de anticuerpo en las células de flujo a 30 µL/min (fase de asociación) seguido por 360 segundos ininterrumpidos de flujo de tampón (fase de disociación). La superficie del chip se regenera (complejo interlequina-12/anticuerpo disociado) mediante dos inyecciones secuenciales de 30 µL cada una de tiocianato de guanidina 2 M.

10 El análisis de los datos se hace usando evaluación BIA 3.0 ó CLAMP 2.0, como se sabe en la técnica. Para cada concentración de anticuerpo se resta el sensograma del blanco del sensograma de la muestra. Se hace un ajuste global tanto para la disociación (k_d , seg^{-1}) como para la asociación (k_a , $\text{mol}^{-1}\text{seg}^{-1}$) y la constante de disociación (K_D , mol) se calcula (k_d/k_a). Donde la afinidad del anticuerpo es lo suficientemente alta que las RU del anticuerpo capturado sean >100 , se corren diluciones adicionales del anticuerpo.

20 Resultados y Discusión

Generación de anticuerpos monoclonales anti-IL-12 humana

25 Se realizan varias fusiones y cada fusión se siembra en 15 placas (1440 pocillos/fusión) que producen varias docenas de anticuerpos específicos para IL-12 humana. De estos, se determina que algunos consisten en una combinación de cadenas de Ig humanas y de ratón. Los hibridomas restantes secretan anticuerpos anti-IL-12 que consisten solamente en cadenas pesadas y ligeras humanas. De los hibridomas humanos se espera que todos sean IgG1.

30 Cinética de unión de anticuerpos humanos anti-IL-12 humana

35 El análisis por ELISA confirma que el anticuerpo purificado de la mayoría o todos estos hibridomas se une a IL-12 de una manera dependiente de la concentración. Las figuras 1-2 muestran los resultados de la eficacia relativa de unión de estos anticuerpos. En este caso, se mide la avidéz del anticuerpo por su antígeno afín (epítipo). Se debe advertir que la unión de IL-12 directamente a la placa de EIA puede producir desnaturalización de la proteína y las afinidades aparentes de unión no pueden reflejar la unión a la proteína desnaturalizada. Se encontró un cincuenta por ciento de unión en un intervalo de concentraciones.

40 Se obtienen constantes cuantitativas de unión usando el análisis por BIAcore de los anticuerpos humanos y revela que varios de los anticuerpos monoclonales humanos tienen gran afinidad con K_D en el intervalo de 1×10^{-9} a 7×10^{-12} .

Conclusiones

45 Se realizan varias fusiones usando esplenocitos de ratones híbridos que contienen transgenes de regiones variables y constantes de anticuerpos humanos que se inmunizan con IL-12 humana. Se generan una serie de anticuerpos monoclonales IgG completamente humanos que reaccionan con IL-12. Los anticuerpos anti-IL-12 completamente humanos se caracterizan adicionalmente. Varios de los anticuerpos generados tienen constantes de afinidad entre 1×10^9 y 9×10^{12} . Las afinidades inesperadamente altas de estos anticuerpos monoclonales completamente humanos los hacen adecuados para aplicaciones terapéuticas en enfermedades, patologías o afecciones relacionadas dependientes de IL-12.

Ejemplo 3: C340 es un anticuerpo monoclonal humano neutralizante

55 Se mostró que la bioactividad de IL-12 se neutralizaba por C340 en una variedad de ensayos de actividad dependientes de IL-12. Puesto que IL-12 aumenta la producción de IFN GAMMA por células NK y linfocitos T, se examinó el efecto del anticuerpo C340 sobre el aumento del ARNm de IFN GAMMA y el efecto de C340 sobre la producción de proteína IFN GAMMA (Trinchieri, G., Current Opinion in Immunology, 9:17-23 (1997), Morris, S.C., et al., Journal of Immunology, 152:1047-1056 (1994)). También se investigó en estos estudios la capacidad de C340 de neutralizar de la actividad celular de aniquilación activada por linfoquina (LAK) dirigida por IL-12 (Kutza, J. y Murasko, D.M., Mechanisms of Ageing and Development, 90:209-222 (1996), Stern, A.S., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 87:6808-6812 (1990)). Por último, se ensayó el efecto de C340 sobre la regulación por ascenso de la expresión de CD95 en la superficie celular de células T y NK mediada por IL-12 (Medvedev, A.E., et al., Cytokine, 9:394-404 (1997)).

65 Inhibición de la transcripción del ARNm de IFN gamma

Para determinar si C340 inhibe la transcripción del gen de IFN GAMMA inducida por IL-12, IL-2 en PBL humanos, se realizó un ensayo de transcripción inversa-PCR. Se usaron cebadores específicos para β -actina (un control para la integridad y contenido de ARNm) e IFN GAMMA para amplificar el ADNc obtenido de PBL humanos estimulados. La figura 3 muestra que C340 disminuye el ARNm de IFN GAMMA en PBMC activadas con IL-12/IL-2 (2 horas).

Inhibición de IFN GAMMA intracelular medida mediante citometría de flujo

En respuesta a varias señales y como una medida de activación, se puede inducir que las células T y las células NK secreten citoquinas. Más específicamente, PBL tratados con IL-2 e IL-12 inician síntesis sustancial de IFN gamma en 4-8 horas tras la estimulación. Esta producción se puede detectar en el citoplasma de PBL tratados con brefeldina-A mediante citometría de flujo. La figura 4 demuestra una reducción del 60% en la producción de IFN GAMMA en tales cultivos cuando C340 IL-12 se añadió junto con IL-12 durante cinco horas.

Inhibición de la secreción de IFN GAMMA inducida por IL-12

La figura 5 claramente muestra que dos lotes diferentes de C340 inhibieron la secreción de IFN GAMMA por linfocitos de sangre periférica en una manera dependiente de la dosis. Se premezclaron cuatrocientos picogramos de IL-12 con cantidades variables de C340 y después se añadieron a cultivos de PBL estimulados con IL-2. Cuando se midió el IFN GAMMA mediante EIA después de una incubación de 18-24 horas, se detectaron cantidades marcadamente disminuidas de IFN GAMMA con tan poco como 1 μ g/mL de anticuerpo C340.

Inhibición de la citotoxicidad celular LAK inducida por IL-12

Las células Raji, una línea celular derivada de linfoma de Burkitt sensible a IL-12, es una línea celular resistente a células NK, sensible a células LAK. Se cultivaron células Raji, en triplicado, durante cuatro horas con células LAK que se habían activado con IL-12 400 pg/mL e IL-2 10 U/mL en presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal humano C340 (5000 ng/mL ó 50 ng/mL). La figura 6 muestra los resultados de tres donantes normales, sanos. La activación por IL-12 + IL-2 de las células efectoras produjo un aumento en la actividad citotóxica sobre la de las células activadas con IL-2 sola. El anticuerpo C340 inhibió este efecto dependiente de IL-12. La magnitud de la inhibición estaba relacionada con la concentración del anticuerpo, reduciendo la máxima concentración ensayada la citotoxicidad a niveles de fondo.

Inhibición del aumento de CD95

Se ha descrito en informes el aumento de CD95 inducido por IL-12 en la superficie de PBL CD56+ muy purificados. Como se puede ver en la figura 7A y 7B, el análisis distribucional de citometría de flujo reveló que la expresión de CD95 estaba significativamente aumentada en células T CD3+ y células NK CD56+ después del tratamiento con IL-12 más IL-2 durante 72 horas. El tratamiento anti-IL-12 concomitante inhibió la expresión de CD95 tanto en poblaciones CD3+ como CD56+. Las células CD3+ se inhibieron en ~50% (Figura 7A), mientras que las células CD56+ se inhibieron en ~85% (Figura 7B), como se evidencia por un índice MFI disminuido (porcentaje mayor que el control sin estimular).

Ejemplo 4: Clonación y caracterización del gen

Se clonaron y purificaron fragmentos de ADN genómico que contenían el gen de la cadena pesada de C340 o el de la cadena ligera de C340. El ADN genómico purificado de las células de hibridoma de C340 se digirió parcialmente con la enzima de restricción Sau3A y se seleccionó por tamaño mediante fraccionamiento por centrifugación mediante un gradiente de sacarosa del 10-40%. Los fragmentos de ADN en el intervalo de tamaño de 15-23 kb se clonaron en el vector bacteriófago, EMBL3, [disponible comercialmente?] y se empaquetaron en partículas de fago. Varias reacciones de empaquetamiento produjeron una genoteca de 1 millón de clones de bacteriófagos. Aproximadamente se cribaron 600.000 clones de la genoteca mediante hibridación en placa usando como sonda fragmentos de ADN genómico marcados con 32P que contenían secuencias de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana o secuencias de la región constante de la cadena ligera kappa humana. Se detectaron trece clones de cadena pesada y nueve de cadena ligera. De estos, se purificaron tres clones de cadena pesada y cuatro clones de cadena ligera mediante dos rondas más de cribado. Se mostró que uno de los clones de cadena pesada y dos de los clones de cadena ligera contenían los extremos 5' y 3' de las secuencias codificantes mediante análisis por PCR del ADN del bacteriófago. El inserto de ADN en el clon de cadena pesada (HC) H4 tenía 16 kb de tamaño e incluye 3,6 kb de secuencia flanqueante 5' y al menos 2 kb de secuencia flanqueante 3'. El inserto de ADN en el clon de cadena ligera (LC) LC1 tenía 15 kb de tamaño e incluía 4,4 kb de secuencia flanqueante 5' y 6,0 kb de secuencia flanqueante 3'. Se sacaron los insertos completos del vector bacteriófago como fragmentos Sall y se clonaron entre los sitios XhoI y Sall del vector plasmídico de expresión p1351, provisto de un gen de marcador de selección gpt. Debido a que hay un sitio Sall interno en la secuencia codificante de la región variable de la cadena pesada, se tuvieron que transferir dos fragmentos Sall del bacteriófago H4 al vector de expresión p1351. Los plásmidos de expresión de la cadena pesada y ligera resultantes se denominaron p1560 y p1558, respectivamente. Se determinaron

las orientaciones de los genes de la cadena pesada y ligera en estos dos plásmidos respecto a las secuencias del vector p1351 usando análisis con enzimas de restricción y PCR, respectivamente. En ambos casos, las orientaciones eran tales que el extremo 5' del fragmento del gen del Ab estaba próximo al extremo 3' del gen gpt. Se secuenciaron ambas hebras de las regiones codificantes de los genes clonados. Las secuencias de los plásmidos p1560 y p1558 se presentan en las figuras 11A-11K y las figuras 13A-13J, respectivamente.

Ejemplo 5: Preparación de líneas celulares recombinantes

El plásmido de la cadena pesada p1560 se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción PvuI y el plásmido de cadena ligera p1558 se linealizó usando la enzima de restricción Sall. se transfectaron células p3X63Ag8.653 (653) y SP2/0-Ag14 (SP2/0) separadamente con los plásmidos linealizados premezclados mediante electroporación y las células se cultivaron y se seleccionaron los transfectantes usando ácido micofenólico como está descrito (Knight, et al., Molecular Immunology 30:1443 (1993)). Se ensayaron los sobrenadantes celulares de las colonias resistentes a ácido micofenólico aproximadamente dos semanas después para IgG humana (es decir, C340 recombinante (rC340)). Para ello, los sobrenadantes celulares se incubaron en placas de 96 pocillos de ELISA que estaban recubiertos con anticuerpos de cabra específicos para la parte Fc de IgG humana. Se detectó la IgG humana que se unió a la placa recubierta usando anticuerpo de cabra anti-IgG humana (cadena pesada + cadena ligera) conjugada con fosfatasa alcalina y sustratos de fosfatasa alcalina como se ha descrito (Knight, et al., Molecular Immunology 30:1443 (1993)). Se transfirieron células de los clones de mayor producción a placas de cultivo de 24 pocillos en medio estándar y se expandieron (IMDM, SBF al 5%, glutamina 2 mM, mezcla de selección de ácido micofenólico). La cantidad de anticuerpo producido (es decir, secretado en el medio de cultivos agotados) se cuantificó cuidadosamente mediante ELISA usando mAb C340 purificado como estándar. Los clones seleccionados se expandieron después en botellas T75 y la producción de IgG humana por estos clones se cuantificó mediante ELISA. Basado en estos valores, se subclonaron seis transfectantes independientes 653 y tres transfectantes independientes SP2/0 (sembrando una media de una célula por pocillo en placas de 96 pocillos), se determinó la cantidad de anticuerpo producido por los subclones ensayando (ELISA) los sobrenadantes de las colonias de los subclones individuales. Se seleccionaron tres subclones, el transfectante de 653 19-20 (C379B) y los transfectantes de SP2/0 84-81 (C381A) y 22-56 (C389A) para análisis adicionales.

Ensayo de unión a antígeno de rC340

Antes de subclonar las líneas celulares seleccionadas como se ha descrito anteriormente, se usaron los sobrenadantes celulares de las tres líneas parentales (transfectantes de 653 clon 2 y clon 18 y transfectante de SP2/0 clon 1) para ensayar las características de unión a antígeno de rC340. Primero se determinaron las concentraciones de rC340 en las muestras de los tres sobrenadantes celulares mediante ELISA. Después se incubaron cantidades de titulación de las muestras de sobrenadante, o control positivo de C340 purificado, en placas de 96 pocillos recubiertos con 2 µg/ml de IL-12 humana. Se detectó el mAb unido con anticuerpo de cabra anti-IgG humana (cadena pesada + cadena ligera) conjugada con fosfatasa alcalina y sustratos adecuados de fosfatasa alcalina. Como se muestra en la figura 8, rC340 se unió específicamente a IL-12 humana en una manera indistinguible del mAb C340 original.

Caracterización de las líneas celulares seleccionadas

Se realizaron análisis de curvas de crecimiento en C379B, C381A y C389A sembrando botellas T75 con una densidad celular inicial de 2 x 10⁵ células/ml en medio estándar o medio SFM-5 sin suero y después controlando el número de células y la concentración de rC340 a diario hasta que los cultivos se agotaron. Los resultados de los cultivos en medio estándar se muestran en las figuras 9A-9C. Los niveles máximos de producción de mAb C340 para C379B, C381A y C389A fueron de 135 µg/ml, 150 µg/ml y 110 µg/ml, respectivamente. Los intentos de adaptar las células C379B al medio SMF-5 no tuvieron éxito. Las células C381A produjeron la misma cantidad de rC340 en medio SFM-5 que en medio estándar, mientras que las células C389A produjeron sólo la mitad de rC340 en medio SFM-5 que en medio estándar.

Se evaluó la estabilidad de la producción de mAb C340 a lo largo del tiempo para los tres subclones cultivando las células en placas de 24 pocillos con medio estándar o medio estándar sin selección de ácido micofenólico durante periodos variables de tiempo. Se observó que las líneas C379B y C381A produjeron de forma estable rC340 en presencia o ausencia de selección durante un periodo de 30 días (el tiempo máximo ensayado) y 75 días, respectivamente. La línea C389A era inestable y después de 43 días de cultivo produjo solo el 20% de anticuerpo que al principio del estudio.

Estará claro que la invención se puede practicar de otra forma a como se ha descrito particularmente en la descripción y ejemplos anteriores.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JANSSEN BIOTECH, Inc.

ES 2 647 220 T3

<120> ANTICUERPOS ANTI-IL-12, COMPOSICIONES, METODOS Y USOS

<130> P055869EP

5 <140> EP 10184116.1
<141> 2001-08-07

10 <150> US 09/920,262
<151> 2001-08-01

<150> US 60/223,358
<151> 2000-08-07

15 <150> US 60/236,827
<151> 2000-09-29

<160> 15

20 <170> PatentIn Ver 3.1

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly
1 5

30 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

40 Gly

<210> 3
<211> 10
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

50 Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 4
<211> 11
55 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

60 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
65 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

ES 2 647 220 T3

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

10 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

20 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

25 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

30 Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

35 Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

40 Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

45 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

50 Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

55 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

60 <210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

65

60

65

ES 2 647 220 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
				20					25					30		
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
10			35					40					45			
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
15	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	Tyr
20					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
				100					105							
25																
	<210>	9														
	<211>	503														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
30	<400>	9														

ES 2 647 220 T3

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
 1 5 10 15
 His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
 20 25 30
 Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
 35 40 45
 His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
 50 55 60
 Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
 85 90 95
 Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
 100 105 110
 Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
 115 120 125
 Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
 130 135 140
 Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
 165 170 175
 Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
 180 185 190
 Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val
 195 200 205
 Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr
 210 215 220

ES 2 647 220 T3

Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser
 225 230 235 240
 5 Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu
 245 250 255
 10 Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu
 260 265 270
 15 Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser
 275 280 285
 20 Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu
 290 295 300
 Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu
 305 310 315 320
 25 Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly
 325 330 335
 30 Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala
 340 345 350
 Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys
 355 360 365
 35 Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu
 370 375 380
 Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser
 385 390 395 400
 40 Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu
 405 410 415
 Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu
 420 425 430
 45 Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe
 435 440 445
 50 Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val
 450 455 460
 Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser
 465 470 475 480
 55 Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu
 485 490 495
 60 Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 500

<210> 10

<211> 15

<212> ADN

65 <213> Homo sapiens

ES 2 647 220 T3

<400> 10
agatatacta tgcac 15

5 <210> 11
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 11
gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact ccgtaaggg c 51

10 <210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 12
gaggcccggg gatcgtatgc tttgatatc 30

20 <210> 13
<211> 42
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 13
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cc 42

25 <210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens
30 <400> 14
gatgcatcca acagggcc 18

35 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 15
cagcagcgta gcaactggcc t 21

40

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo anti-IL-12 que tiene una región que se une al antígeno que comprende tres CDR de cadena pesada (CDR1, CDR2, CDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y tres CDR de cadena ligera (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, para su uso en el tratamiento de artritis psoriásica.
- 10 2. El anticuerpo anti-IL-12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:7 y un dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:8, y en el que el anticuerpo es IgG1.
- 15 3. El anticuerpo anti-IL-12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a IL-12 con una afinidad representada por un K_D de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M, al menos 10^{-11} M, o al menos 10^{-12} M.
- 20 4. Una composición que comprende el anticuerpo anti-IL-12 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de artritis psoriásica.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además al menos una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto o proteína seleccionado de al menos uno de un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina y un antagonista de citoquina.
- 30 6. El anticuerpo anti-IL-12 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo o composición es adecuado para el contacto o administración por la menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardial, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.
- 35 7. El anticuerpo anti-IL-12 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el uso comprende administrar, antes concurrentemente o después de dicho anticuerpo o composición, al menos una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto o proteína seleccionado de al menos uno de un marcador o indicador detectable, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano, un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina y un antagonista de citoquina.
- 40
- 45

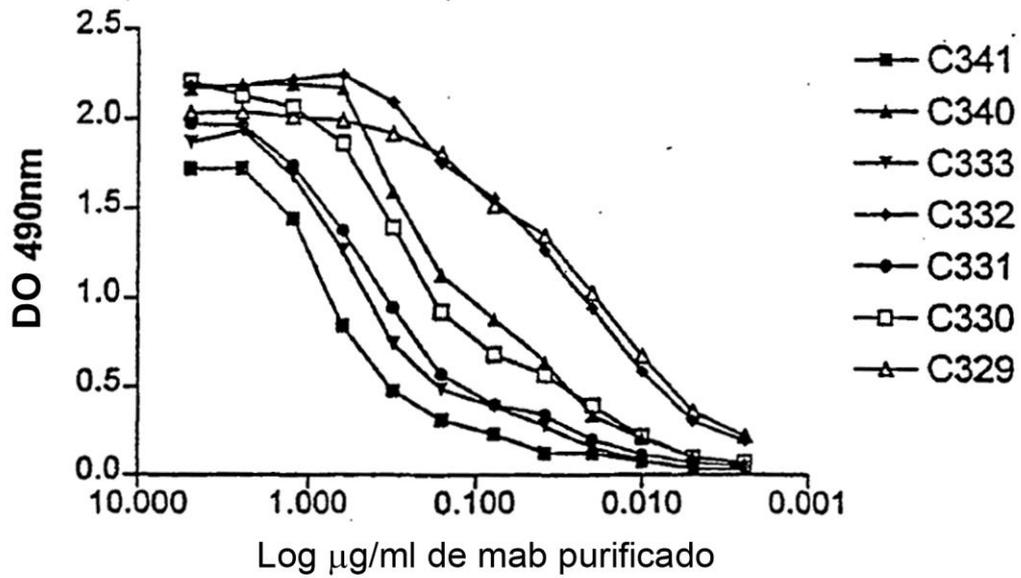


FIGURA 1A

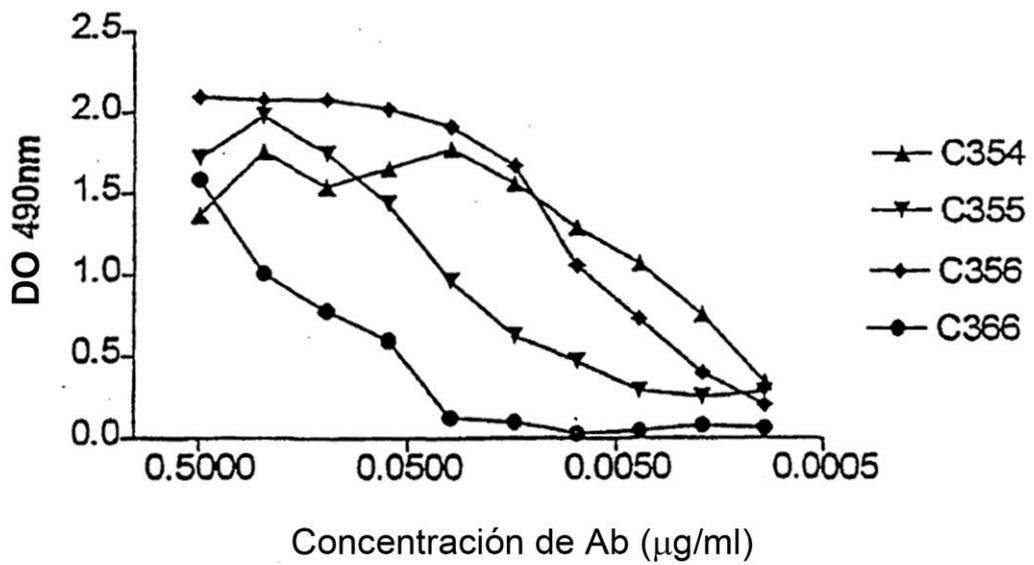


FIGURA 1B

FIGURA 2A

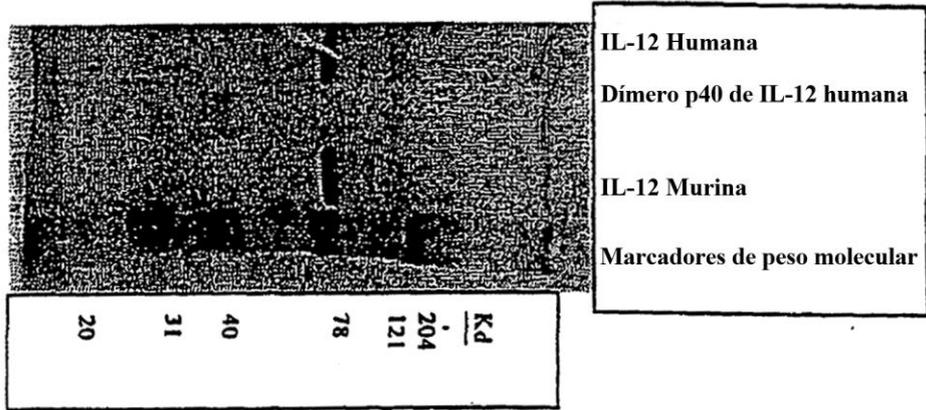
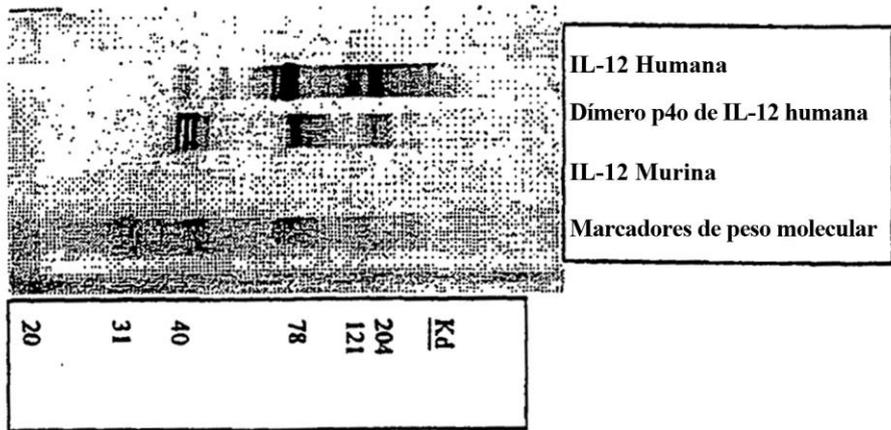


FIGURA 2B



Donante 1411 Donante 1457

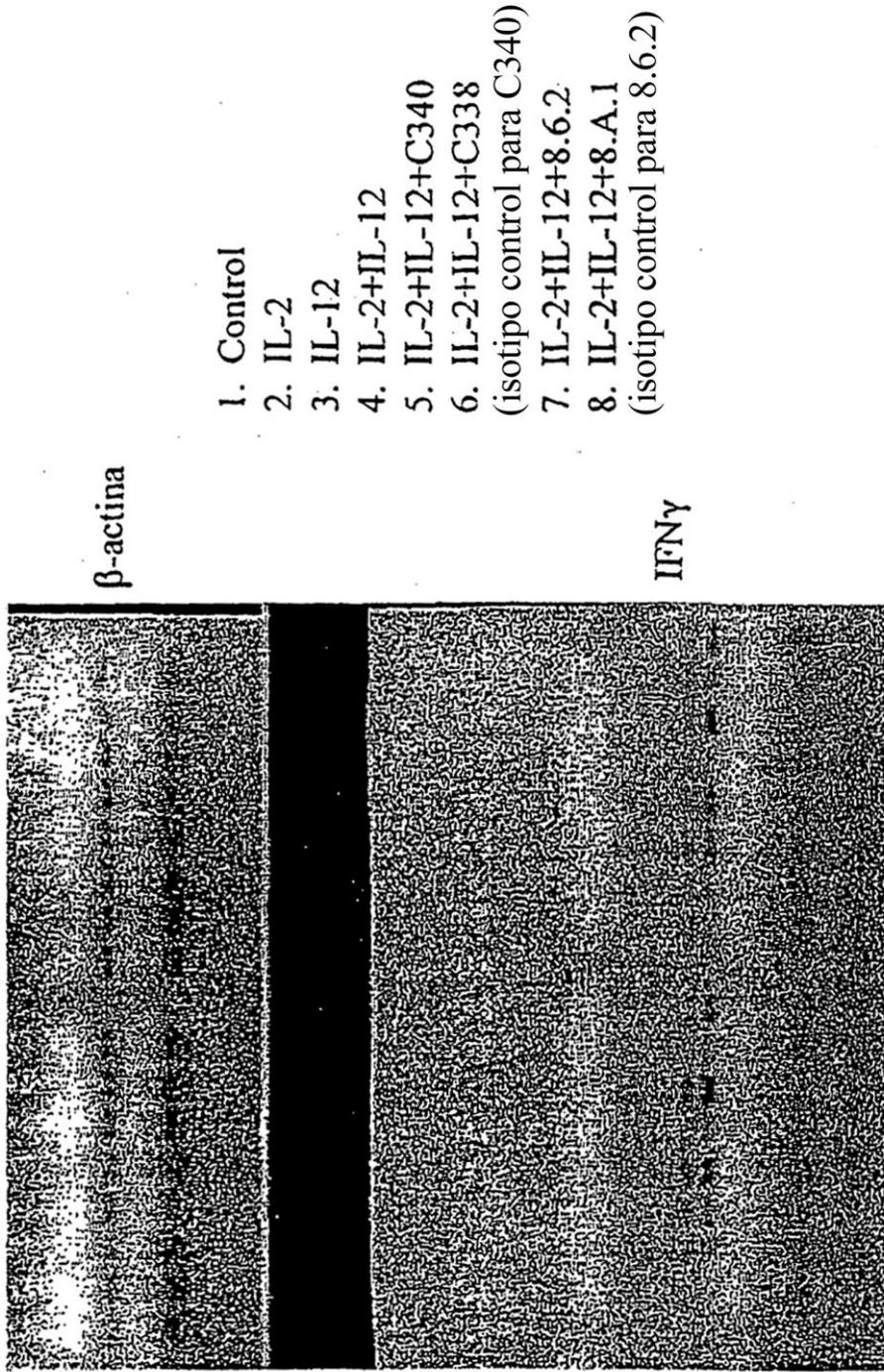


FIGURA 3

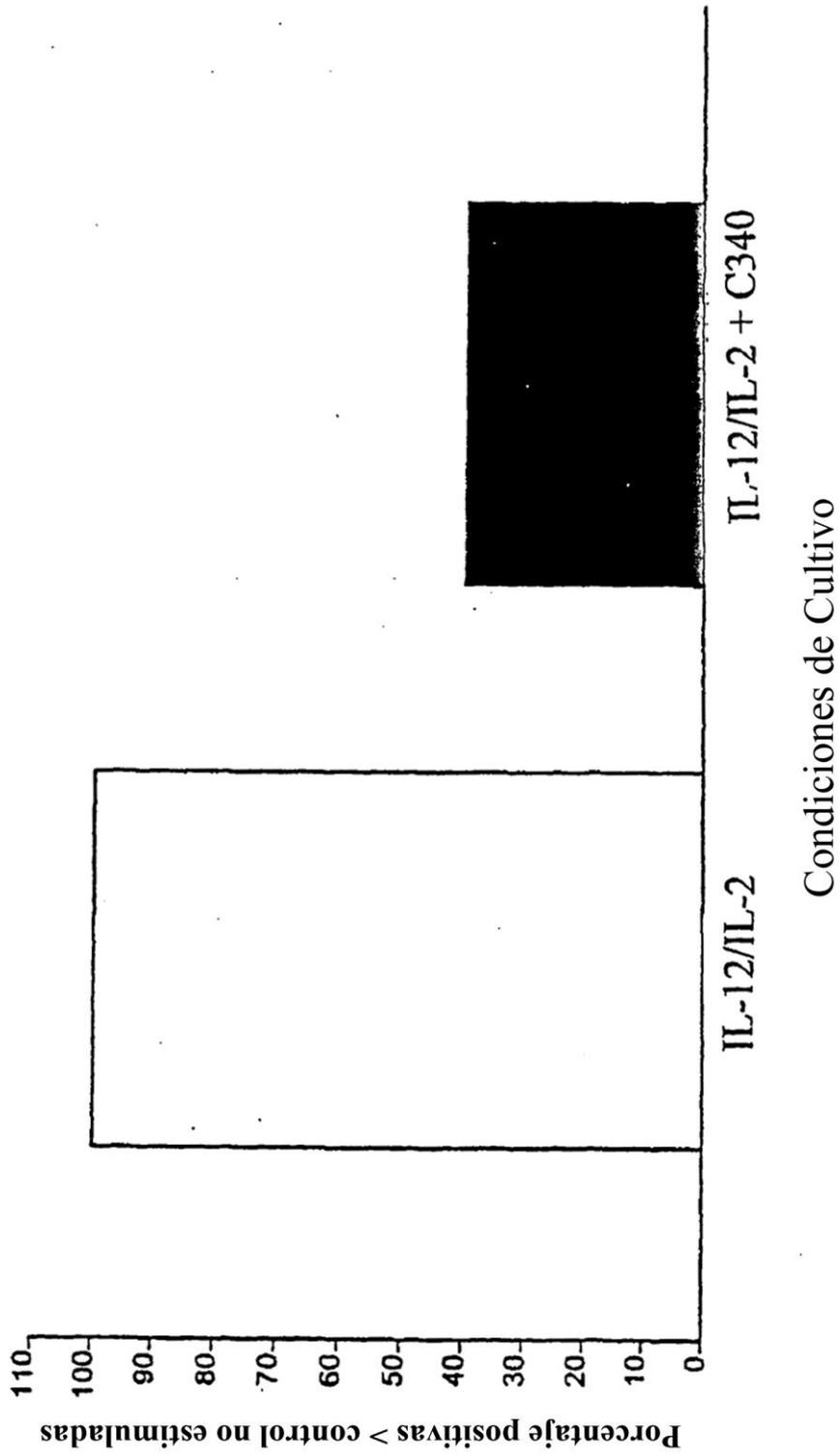


FIGURA 4

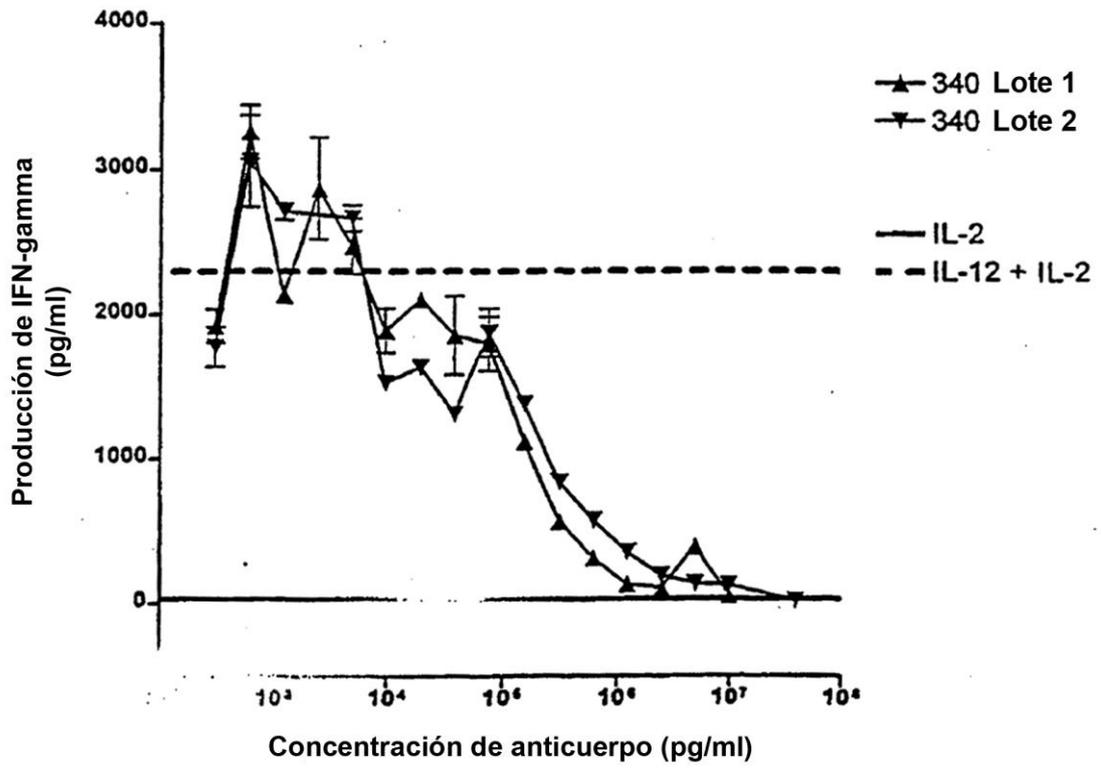


FIGURA 5

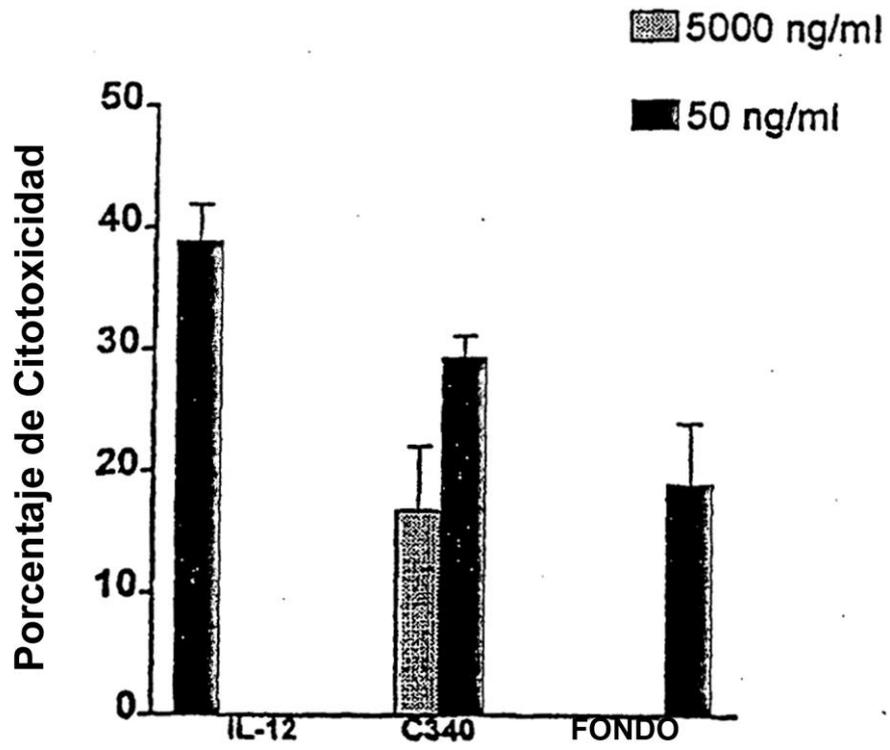


FIGURA 6

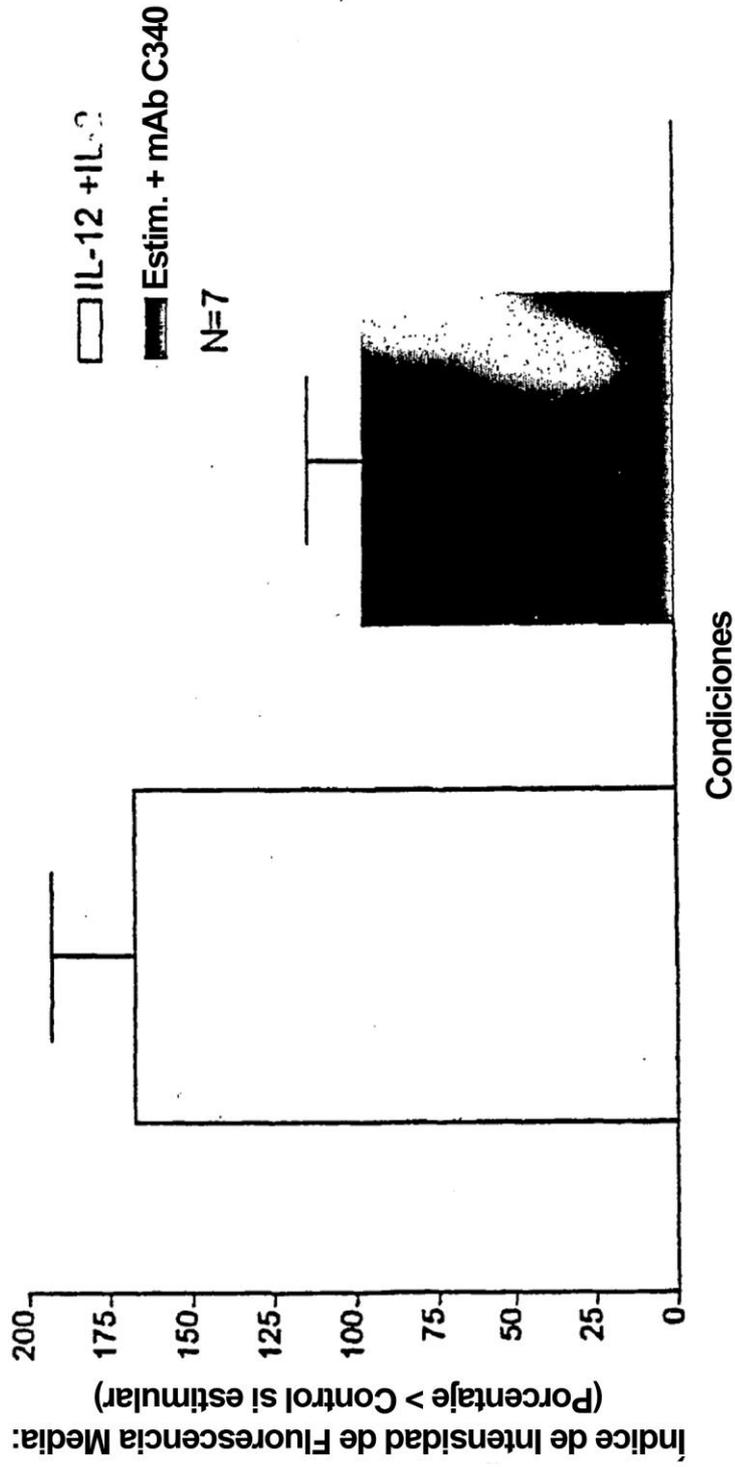


FIGURA 7A

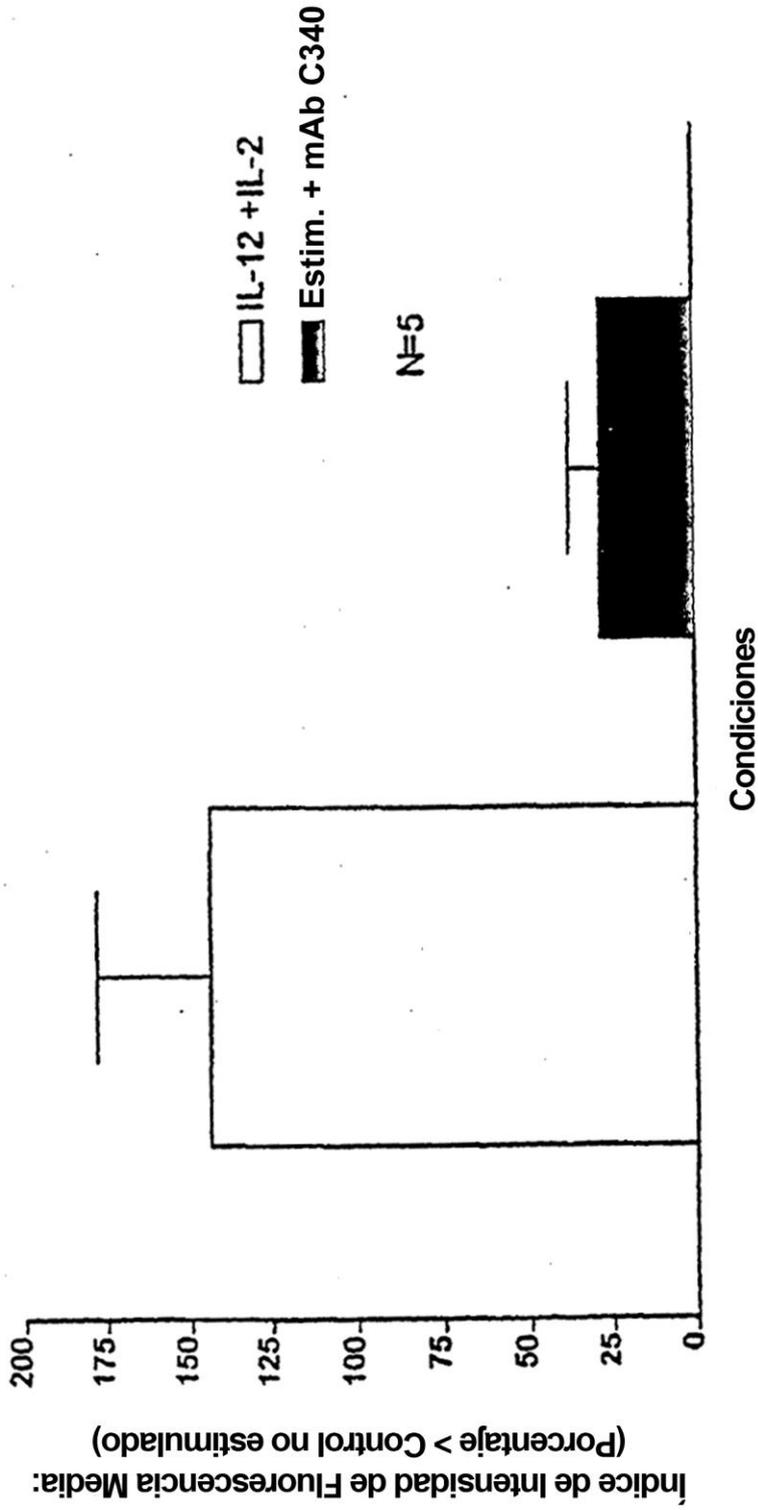


FIGURA 7B

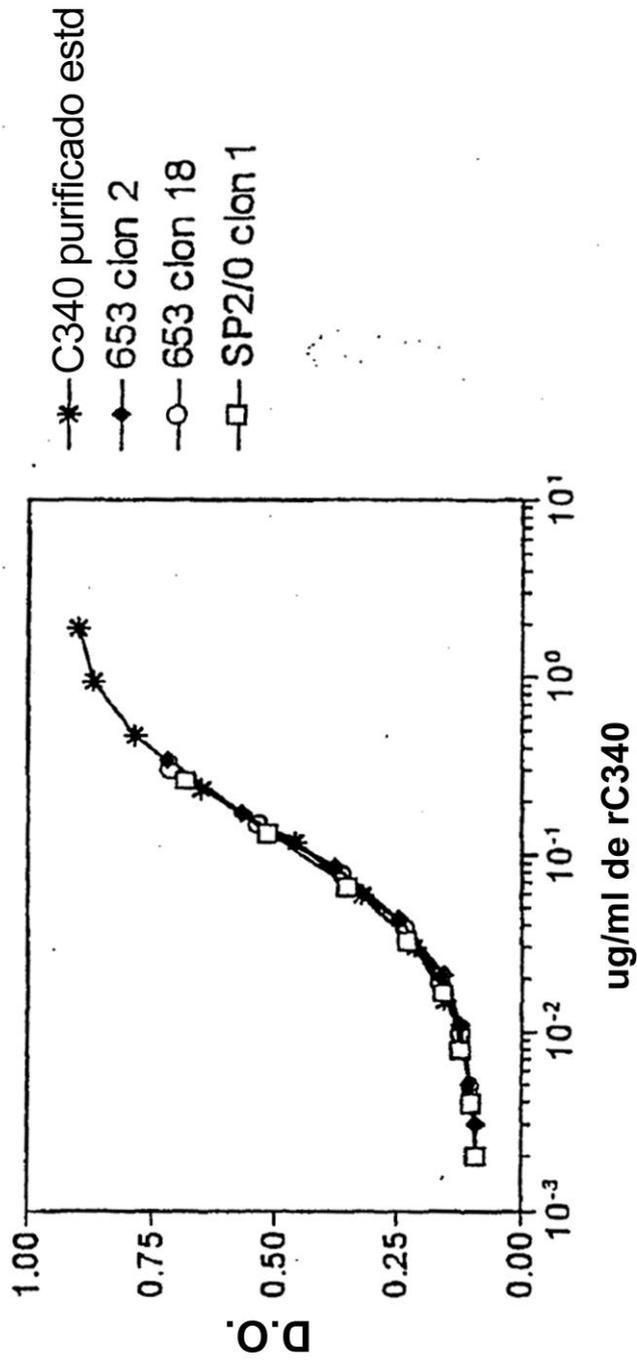


FIGURA 8

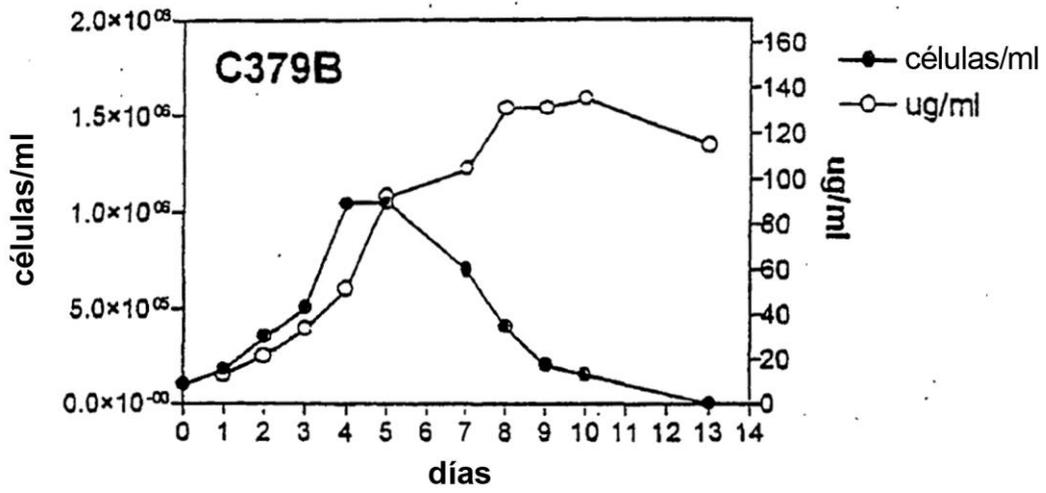


FIGURA 9A

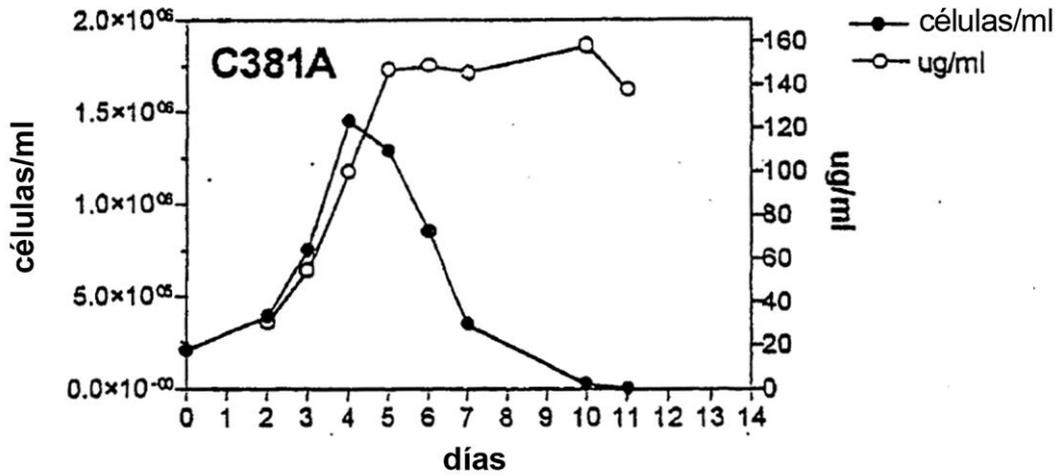


FIGURA 9B

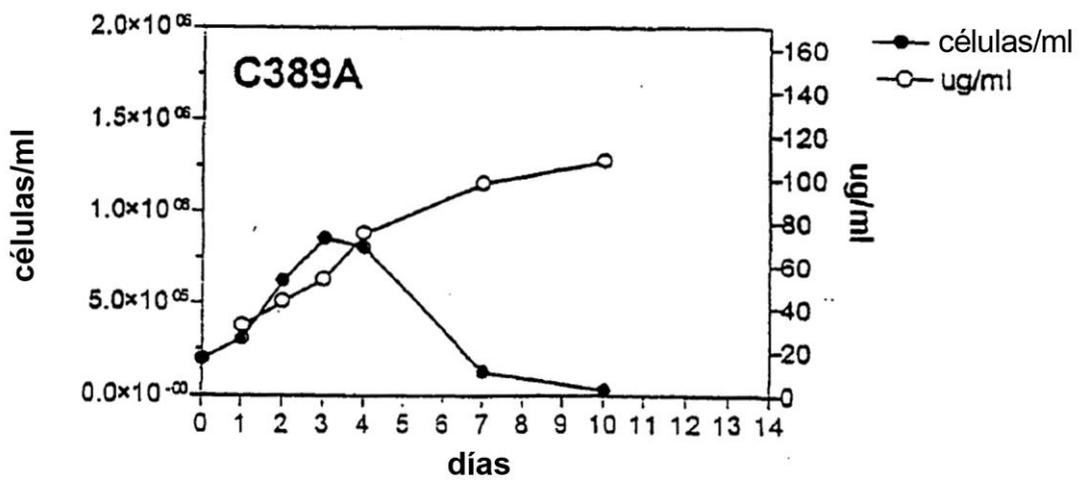


FIGURA 9C