

# Industria y Comercio

Organizacion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de propiedad Industrial

Organizacion CSA Ltda

División de Nuevas Creaciones

PCT  
SOLICITUD

NOV 2/2

## PATENTE DE INVENCION

07-62847

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ANTICUERPOS ANTI-IL-12, Y EPITOPES, COMPOSICIONES, METODOS DE  
OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K39/395

71. SOLICITANTE

CENTOCOR, INC.

DOMICILIO

MALVERN, PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,



No. 07-062847- -00000-0000

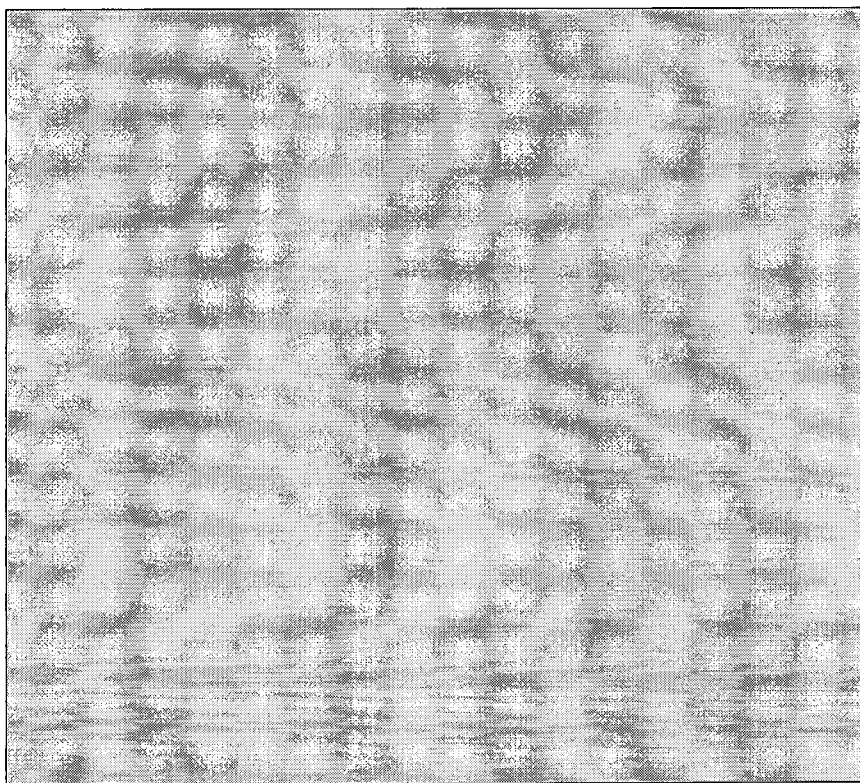
Fecha: 2007-06-21 16:07:40 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 230

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

|                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 SOLICITUD DE:</b>                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad |                                                                                                                                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <input type="checkbox"/> Capítulo II                   |                                                                                                                                                                                             |
| <b>2 SOLICITANTE (71)</b>                                                                                                                                                                                 | Nombre: <b>CENTOCOR, INC.</b><br>Dirección: 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América.<br>Nacionalidad o Domicilio: Malvern, Pennsylvania, Estados Unidos de América<br>Lugar de Constitución: Pennsylvania, Estados Unidos de América<br>Teléfono: Fax:<br>E-mail: |                                                        | <b>IDENTIFICACIÓN</b><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br>Número                                |
| <b>3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)</b>                                                                                                                                                                   | Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE<br>Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6<br>Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889<br>E-mail: tm-patent@escobaruribe.com                                                                                                                                                           |                                                        | <b>IDENTIFICACIÓN</b><br>C.C. <input checked="" type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br>Número 39.779.452T.P 68228 |
| <b>4 INVENTOR (ES) (72)</b>                                                                                                                                                                               | Nombre: <b>VER ANEXOS</b><br>Dirección:<br>Nacionalidad o domicilio:                                                                                                                                                                                                                                       |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>5 PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/046063</u> Fecha <u>20 de diciembre de 2005</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO 2006/069036 A2</u> Fecha <u>29 de junio de 2006</u> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>6 TITULO (54)</b> <u>ANTICUERPOS ANTI-IL-12. Y EPITOPES. COMPOSICIONES. METODOS DE OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS. Ver folio 246</u>                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>7 Clasificación Internacional (51)</b> <u>A61K39/395</u>                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>8 Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                                  | (33) País de Origen<br><u>Estados Unidos de América</u>                                                                                                                                                                                                                                                    | (32) Fecha<br><u>21 de diciembre de 2004</u>           | (31) Número de Solicitud<br><u>60/637,819</u>                                                                                                                                               |
| <b>9 Comprobante de pago No.</b> <u>07 - 47.967</u> <b>Fecha</b> <u>14 de junio de 2007</u>                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                        |                                                                                                                                                                                             |

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA



## 12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar*

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

3071

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 47,967  
FECHA : JUNIO 14 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-062847- -00000-0000

Fecha: 2007-06-21 16:07:40 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONAL  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE             | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | Nº. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|-------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| ESCOBAR URIBE ASOCIADOS | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 66415406 | 14/06/2007 | 2,892,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                         |                |
|       |             | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 482,000.00     |
|       |             | TOTAL :                             | \$ 482,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 5948 DE SELLOS ESCRITOS EN INGLES EN UN DOCUMENTO ESCRITO EN ESPAÑOL/INGLES, EL CUAL, PARA SU IDENTIFICACIÓN, SE SELLA, AL IGUAL QUE ESTA TRADUCCIÓN, CON EL SELLO DE MARÍA MARGARITA CANCINO M., TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL EN INGLÉS SEGÚN RESOLUCIÓN NO. 1448 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.

HAY TEXTO DE PODER OTORGADO A DOS COLUMNAS EN TEXTO IDÉNTICO EN INGLÉS Y ESPAÑOL POR PARTE DE CENTOCOR, INC., DOMICILIADA EN 200 GREAT VALLEY PARKWAY, MALVERN, PENNSYLVANIA, 19355, A FAVOR DE JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO ESCOBAR-URIBE

HAY UNA FIRMA ILEGIBLE AL FINAL DEL DOCUMENTO

Correspondiente al señor Guy Kevin Townsend

Subsecretario

Firmado en New Brunswick, N.J. Estados Unidos

El 27 de marzo de 2003.

Hay sello seco de NOTARIO PUBLICO – New Jersey

Firmado: Christina A. Clickner

Notario Público, Estado de New Jersey

Mi comisión expira en marzo 2, 2005

EN PÁGINA ADJUNTA HAY APOSTILLA

#### APOSTILLA

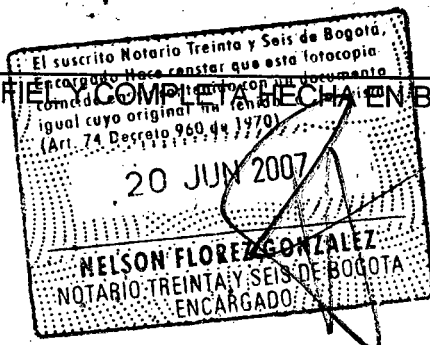
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de America  
Este documento público
2. ha sido firmado por: Christina A. Clickner
3. actuando en su capacidad de: Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello de : Christina A. Clickner - Notario

#### CERTIFICADO

5. en Trenton
6. el 24 de abril de 2003
7. por John E. McCormac, CPA, Tesorero New Jersey
8. No. A179758
9. Sello: Tesoreria New Jersey
10. Firma: Ilegible.

ESTA ES UNA TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA FECHA EN BOGOTÁ EL 23 DE MAYO DE 2003



*Maria Margarita Cancino M.*  
MARIA MARGARITA CANCINO M.  
Traductora e Intérprete Oficial  
Resolución No. 1448 Minjusticia

ND SEASUNE  
MANUEL TEXTO  
20 JUN 2007  
A 10:10

442 Concurs

El suscrito Notario Treinta y Seis de Bogotá,  
Encargado Hace constar que esta fotocopia  
coincide en su contenido con un documento  
igual cuyo original ha tenido a la vista  
(Art. 74 Decreto 960 de 1970).

20 JUN 2007

NELSON FLOREZ GONZALEZ  
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA  
ENCARGADO

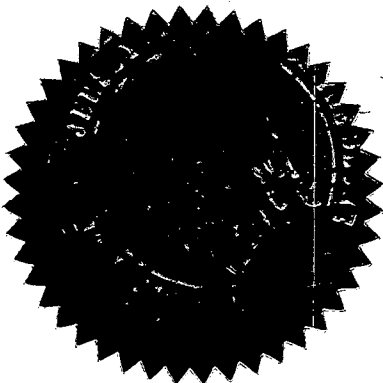
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:  
CHRISTINA A CLICKNER
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:  
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:  
CHRISTINA A CLICKNER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 24TH DAY OF APRIL 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A170758
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



*John E McCormac*



## POWER OF ATTORNEY

The undersigned **GUY KEVIN TOWNSEND**acting on behalf of and representing **CENTOCOR, INC.**

, a company organised and existing under the laws of

**PENNSYLVANIA**

domiciled at

**200 GREAT VALLEY PARKWAY  
MALVERN, PENNSYLVANIA 19355**

hereby appoints

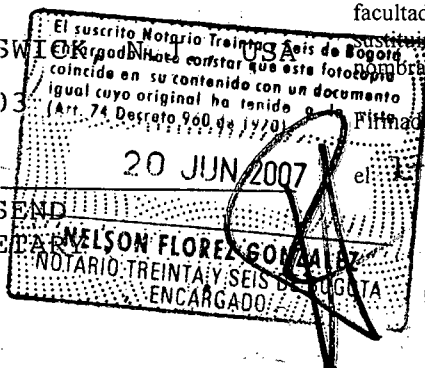
**JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO  
ESCOBAR-URIBE**

domiciled at Bogota, Colombia

**CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306**

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial ensigns and names, trademarks, domain names, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtentor of plant varieties rights. To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general to take, before said authorities, pertinent steps to the above-mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed at **NEW BRUNSWICK**on **MARCH 27, 2003****GUY KEVIN TOWNSEND  
ASSISTANT SECRETARY**

## DOCUMENTO DE PODER

El suscrito **GUY KEVIN TOWNSEND**obrando en nombre y representación de **CENTOCOR, INC.**, una compañía organizada y existente bajo las leyes de **PENNSYLVANIA**

con domicilio en

**200 GREAT VALLEY PARKWAY  
MALVERN, PENNSYLVANIA 19355**

nombra a

**JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO  
ESCOBAR-URIBE**

domiciliados en Bogotá, Colombia

**CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306**

apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, nombres de dominio, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseññas, registros sanitarios, así como sus trasposos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o enseña comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtentor de variedades vegetales. A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio. Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, y revocar sustituciones, recibir notificaciones y apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en **NEW BRUNSWICK, N.J., USA**el **27 de Marzo de 2003**

**CHRISTINA A. CLICKNER  
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY  
MY COMMISSION EXPIRES MAR. 2, 2005**

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 5949 de UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, EL CUAL, PARA SU IDENTIFICACIÓN, SE SELLA, AL IGUAL QUE ESTA TRADUCCIÓN, CON EL SELLO DE MARÍA MARGARITA CANCINO M., TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL EN INGLÉS SEGÚN RESOLUCIÓN NO. 1448 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA.

CEN 186/249 COLOMBIA

### CERTIFICADO DE NOTARIO PUBLICO

Yo, CHRISTINA A. CLICKNER, Notario Público del Estado de New Jersey, con comisión que expira el 2 de marzo de 2005, certifico lo siguiente:

1. CENTOCOR INC. Es una compañía del Estado de Pennsylvania
2. GUY KEVIN TOWNSEND es el Subsecretario de CENTOCOR., INC. y está autorizado para ejecutar el poder fechado el 27 de marzo de 2003 a favor de JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO ESCOBAR-URIBE.

Ejecutado EL 27 de marzo de 2003-05-25

Firmado por  
CHRISTINA A. CLICKNER

Hay sello seco de NOTARIO PUBLICO – New Jersey  
Firmado: Christina A. Clickner  
Notario Público, Estado de New Jersey  
Mi comisión expira en marzo 2, 2005

### EN PÁGINA ADJUNTA HAY APOSTILLA APOSTILLA

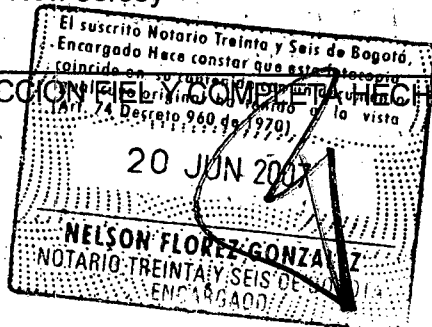
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América  
Este documento público
2. ha sido firmado por: Christina A. Clickner
3. actuando en su capacidad de: Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello de : Christina A. Clickner - Notario

### CERTIFICADO

5. en Trenton
6. el 24 de abril de 2003
- 7- por John E. McCormac, CPA, Tesorero New Jersey
8. No. A179759
9. Sello: Tesoreria New Jersey
10. Firma: Ilegible.

ESTA ES UNA TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA HECHA EN BOGOTÁ EL 23 DE MAYO DE 2003



*Maria Margarita Cancino M.*  
MARIA MARGARITA CANCINO M.  
Traductora e Intérprete Oficial  
Resolución No. 1448 Minjusticia

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
20 JUN 2007 10 11 10  
SOLICITUD

20 JUN 2007  
HH Concursos  
CALLE 100 N. 100  
BOGOTÁ D.C.

El suscrito Notario Treinta y Seis de Bogotá,  
Encargado Hace constar que esta fotocopia  
coincide en su contenido con un documento  
igual cuyo original ha sido a la vista  
(Art. 74 Decreto 910 de 1970)

20 JUN 2007

NELSON FLOREZ GONZALEZ  
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTÁ  
ENCARGADO

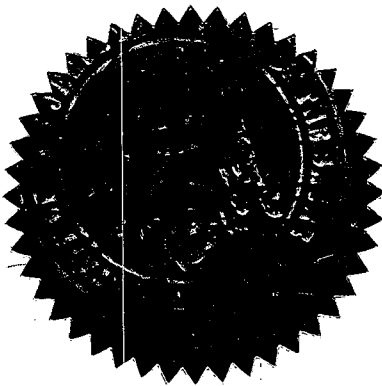
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

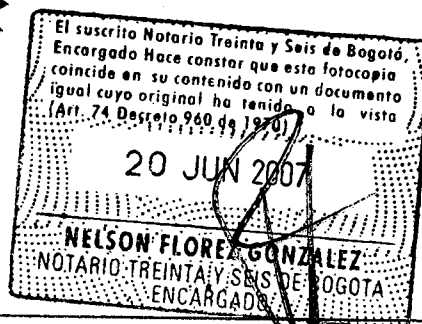
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:  
CHRISTINA A CLICKNER
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:  
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:  
CHRISTINA A CLICKNER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 24TH DAY OF APRIL 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A170759
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



*John E McCormac*



CEN 186/249 COLOMBIA

**CERTIFICATION BY PUBLIC NOTARY**

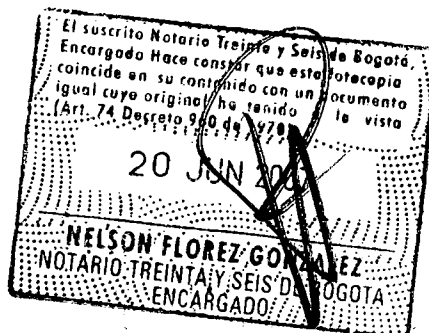
I, CHRISTINA A. CLICKNER, a Notary Public of the State of New Jersey whose commission expires on March 2, 2005 certify as follows:

1. CENTOCOR, INC. is a corporation of the State of Pennsylvania.
2. GUY KEVIN TOWNSEND is an Assistant Secretary of CENTOCOR, INC. and was authorized to execute the Power of Attorney dated March 27, 2003 in favor of JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO ESCOBAR-URIBE.

Executed this 27<sup>th</sup> day of March, 2003

  
CHRISTINA A. CLICKNER

**CHRISTINA A. CLICKNER  
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY  
MY COMMISSION EXPIRES MAR. 2, 2005**



## ANEXOS

### INVENTORES

1. ) **GILES-KOMAR, Jill**  
( 31 Blakely Road, Downingtown, Pennsylvania 19335, Estados Unidos de América );
2. ) **HEAVNER, George**  
( 9 Oak Glen Drive, Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América);
3. ) **KNIGHT, David**  
( 2430 Whitehorse Road, Berwyn, Pennsylvania 19312, Estados Unidos de América );
4. ) **LUO, Jinquan**  
( 46 Knickerbocker Lane, Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América);
5. ) **PERITT, David**  
( 407 Conshohocken State Road, Bala Cynwyd, Pennsylvania 19004, Estados Unidos de América );
6. ) **SCALLON, Bernard**  
( 730 Outpost Circle, Wayne, Pennsylvania 19087, Estados Unidos de América);
7. ) **SHEALY, David**  
( 1351 Pennsridge Place, Downingtown, Pennsylvania 19335, Estados Unidos de América ).

Solicito expresamente a nombre de la sociedad **CENTOCOR, INC**, sociedad constituida de conformidad con las leyes del Estado de Pennsylvania, Estados Unidos de América, domiciliada en 200 Great Valley Parkway, Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **"ANTICUERPOS ANTI-IL-12, Y EPITOPES, COMPOSICIONES, METODOS DE OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS "**.

Clase: A61

  
**JIMENA ESCOBAR URIBE**  
**C.C. 39.779.452 de Usaquen.**  
**T.P. 68.228**

|                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                        |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b>                                                                                                 |  |
| (21) N° de solicitud:<br><br>22) Fecha de solicitud:<br><br>(30) Prioridad Estadinense<br>(31) <b>No. Prioridad</b><br>60/637,819<br>(32) <b>Fecha</b><br>21/12/04<br>(33) <b>País</b><br>US                |  | (51) Int Cl: A61<br><br>(71) Solicitante(s) CENTOCOR, INC.<br><br>(72) Inventor(es) GILES-KOMAR, Jill //<br>HEAVNER, George //<br>KNIGHT, David //<br>LUO, Jinquan //<br>PERITT, David //<br>SCALLON, Bernard //<br>SHEALY, David.<br><br>(74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE |  |
| (85) Fecha inicio fase nacional:<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: <b>Fecha 20/12/05</b><br>No. de solicitud <b>PCT/US2005/046063</b> |  | (87) Publicación internacional<br>Fecha: <b>Fecha (dd/mm/aa) 29/06/06</b><br>N° publicación: <b>WO 2006/069036 A2</b>                                                                                                                                                       |  |
| (54) Título: <b>ANTICUERPOS ANTI-IL-12, Y EPITOPES, COMPOSICIONES, METODOS DE OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS.</b>                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |

Reivindicación(es):

1.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos 1 a 88 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

23.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, que comprende proveer una célula hospedera o animal no humano transgénico o célula vegetal o planta transgénica capaz de expresar, en cantidades recuperables, dicho anticuerpo.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

Un anticuerpo anti-IL-12 que se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de la subunidad p40 de la IL-12, incluyendo ácidos nucleicos aislados que codifican para por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, vectores, células hospederas, animales o plantas transgénicos, y métodos para obtener y usar los mismos, tiene aplicaciones en composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y/o terapéuticos.

15

20 MG

P07/1027F

12

**ANTICUERPOS ANTI-IL-12, Y EPITOPES, COMPOSICIONES, METODOS  
DE OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS**

**CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluyendo porciones o variantes especificadas, específicos para por lo menos una proteína de IL-12 o fragmentos de la misma, así como anticuerpos antiidiotípicos, regiones de epítotope de los anticuerpos, porciones, variantes y fragmentos, y ácidos nucleicos que codifican para dichos anticuerpos anti-IL-12, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células hospederas, y métodos para obtener y usar los mismos, incluyendo formulaciones, administración y dispositivos terapéuticos.

15

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La interleucina-12 (IL-12) es una citocina heterodimérica que consiste de cadenas polipeptídicas glucosiladas de 35 y 40 kD, las cuales están unidas por puentes disulfuro. La citocina es sintetizada y secretada por células que presentan antígeno, que incluyen células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B, células de Langerhans y queratinocitos, así como células asesinas naturales (NK). La IL-12 media una variedad de procesos biológicos, y ha sido referida como factor estimulador de células NK (NKSF),

factor estimulador de células T, factor de maduración de linfocitos T citotóxicos y factor de líneas de células B transformadas por EBV (Curfs, J. H. A. J. *et al.*, Clinical Microbiology Reviews, 10: 742-780 (1997)).

La interleucina-12 puede unirse al receptor de IL-12 expresado  
5 sobre la membrana plasmática de las células (por ejemplo, células T, células 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 NK y células T preactivadas, mejorar la actividad citolítica de células T citotóxicas (CTL), células NK y células LAK (células  
10 asesinas activadas por linfocina), inducir la producción de interferón gamma (IFN GAMMA) por células T y células NK, e inducir diferenciación de células Th0 no afectadas en células Th1 que producen IFN GAMMA e IL-2 (Trinchieri, G., Annual Review of Immunology, 13: 251-276 (1995)). En particular, la IL-12 es vital para la generación de células citolíticas (por ejemplo, NK, CTL) y para  
15 el montaje de una respuesta inmune celular (por ejemplo, una respuesta inmune mediada por células Th1). De esta manera, la IL-12 es críticamente importante en la generación y regulación de inmunidad protectora (por ejemplo, erradicación de infecciones) y respuestas inmunes patológicas (por ejemplo, autoinmunidad) (Hendrzak, J. A. y Brunda, M. J., Laboratory  
20 Investigation 72: 619-637 (1995)). Por consiguiente, una respuesta inmune (por ejemplo, protectora o patogénica) puede ser mejorada, suprimida o prevenida por la manipulación de la actividad biológica de IL-12 *in vivo*, por ejemplo, por medio de un anticuerpo.

Anticuerpos de mamífero no humano, quiméricos, policlonales (por ejemplo, antisueros) y/o monoclonales (Mabs) y fragmentos (por ejemplo, digestión proteolítica o productos de proteínas de fusión de los mismos), son agentes terapéuticos potenciales que están siendo investigados en algunos

5 casos para intentar tratar ciertas enfermedades. Sin embargo, dichos anticuerpos o fragmentos pueden inducir una respuesta inmune cuando se administran a humanos. Dicha respuesta inmune puede resultar en una depuración mediada por el complejo inmune de los anticuerpos o fragmentos de la circulación, y puede hacer que la administración repetida sea

10 inconveniente para terapia, reduciendo de esta manera 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 porciones no humanas, puede llevar a anafilaxis y/o enfermedad por el suero. Para evitar estos y otros problemas, se han

15 llevado a cabo muchos procedimientos para reducir la inmunogenicidad de dichos anticuerpos y porciones de los mismos, incluyendo quimerización y humanización, como es bien sabido en la técnica. Sin embargo, estos y otros procedimientos pueden resultar aún en anticuerpos o fragmentos que tienen cierta inmunogenicidad, baja afinidad, baja avidéz, o con problemas en el

20 cultivo de células, aumento en proporción, producción y/o bajos rendimientos. De esta manera, dichos anticuerpos o fragmentos pueden ser menos que idealmente adecuados para fabricación o uso como proteínas terapéuticas.

Por consiguiente, existe la necesidad de proveer anticuerpos

anti-IL-12 o fragmentos que superen uno o más de estos problemas, así como mejoras sobre los anticuerpos o fragmentos conocidos de los mismos.

### **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

5

La presente invención provee anticuerpos anti-IL-12 aislados de humano, inmunoglobulinas, fragmentos, productos de desdoblamiento y otras porciones y variantes especificadas de los mismos, así como composiciones de anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos antiidiotípicos de IL-12, regiones de  
10 epítotope de los anticuerpos, porciones, variantes y fragmentos, ácidos nucleicos codificantes o complementarios, vectores, células hospederas, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos, plantas transgénicas, y métodos para obtener y usar los mismos, como se describe y se permite en la presente, en combinación con lo que se sabe en la técnica.

15

La presente invención provee también un método para alterar la potencia/actividad (por ejemplo, unión) de un anticuerpo, alterando uno o más residuos de aminoácido en la región variable del anticuerpo, y poniendo a prueba las propiedades de la composición de anticuerpo resultante.

La presente invención provee, en un aspecto, moléculas de  
20 ácido nucleico aisladas que comprenden, que son complementarias a, o que hibridan con, un polinucleótido que codifica para anticuerpos anti-IL-12 específicos o anticuerpos antiidiotípicos, que comprenden por lo menos una secuencia especificada, dominio, porción o variante de las mismas. La

presente invención provee además vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico de anticuerpos anti-IL-12, células hospederas que contienen dichos ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos para obtener y/o usar dichos ácidos nucleicos de los anticuerpos, vectores y/o células hospederas.

La presente invención provee también por lo menos un método para expresar por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, o anticuerpo antiidiotípico de IL-12, en una célula hospedera, que comprende cultivar una célula hospedera como se describe en la presente, bajo condiciones en donde por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 es expresado en cantidades detectables y/o recuperables.

La presente invención provee también por lo menos una composición que comprende (a) un ácido nucleico que codifica para anticuerpos anti-IL-12 aislados y/o anticuerpos como se describe en la presente; y (b) un vehículo o diluyente adecuado y/o farmacéuticamente aceptable.

La presente invención provee además por lo menos un método o composición de anticuerpos anti-IL-12 para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva, para modular o tratar por lo menos una condición relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, y/o antes de, subsiguiente a, o durante, una condición relacionada, como es sabido en la técnica y/o como se describe en la presente.

La presente invención provee también por lo menos una

composición, dispositivo y/o método de suministro de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, de conformidad con la presente invención.

La presente invención provee además por lo menos un método o  
5 composición de anticuerpo anti-IL-12, para el diagnóstico de por lo menos una condición relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, y/o antes de, subsiguiente a, o durante, una condición relacionada, como es sabido en la técnica y/o como se describe en la presente.

La presente invención provee también por lo menos una  
10 composición, dispositivo y/o método de suministro para el diagnóstico de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, de conformidad con la presente invención.

Provisto también es un dispositivo médico, que comprende por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero de la invención, en donde el dispositivo es adecuado para la puesta en contacto o administración del  
15 anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno), anticuerpo antiidiotípico de IL-12, molécula de ácido nucleico, compuesto, proteína y/o composición.

Provisto también es un artículo de fabricación para uso farmacéutico o diagnóstico en humanos, que comprende material de empacamiento y un contenedor que comprende una solución o una forma  
20 liofilizada de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero de la presente invención. El artículo de fabricación puede tener opcionalmente el contenedor como un componente de un dispositivo o sistema de suministro.

La presente invención provee además cualquier invención

descrita en la presente.

### **BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

5                    La figura 1 muestra la estructura molecular del complejo unido de IL-12/Fab de p40 en una representación de bandas.

La figura 2 muestra el sitio de unión del anticuerpo monoclonal p40 (epítope) representado sobre la superficie molecular en representaciones de superficie y de bandas. El dominio D1 y Fv están aislados de la estructura del complejo para claridad. Para el dominio D1 de p40, se muestra la  
10                    superficie molecular. La parte Fv del Fab se muestra en bandas. Panel de la izquierda: vista inferior del sitio de unión al anticuerpo, es decir, el epítope. Panel intermedio: vista de aproximadamente 90° de la vista en el panel de la izquierda. Panel de la derecha: representación de bandas de los residuos del  
15                    epítope.

La figura 3 muestra los resultados de una evaluación por ELISA del anticuerpo p40 de IL-12 unido a varios mutantes individuales de p40.

La figura 4 muestra la afinidad de unión relativa del anticuerpo monoclonal p40 a diferentes muteínas de p40.

20

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención provee anticuerpos anti-IL-12 aislados,

recombinantes y/o sintéticos de humano, y anticuerpos anti-idiotípicos de IL-12 para los mismos, así como composiciones y moléculas de ácido nucleico codificantes que comprenden por lo menos un polinucleótido que codifica para por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 o anticuerpo anti-idiotípico. La presente  
 5 invención incluye además, pero no está limitada a, métodos para producir y usar dichos ácidos nucleicos y anticuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos, incluyendo composiciones, métodos y dispositivos terapéuticos y de diagnóstico.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo "anti-IL-12",  
 10 "anticuerpo de IL-12", "porción 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 contenga proteínas o péptidos que comprendan por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitada a, por lo menos una región determinante de  
 15 complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de estructura, o cualquier porción de la misma, o por lo menos una porción de un receptor de IL-12 o proteína de unión, que pueda incorporarse en un  
 20 anticuerpo de la presente invención. Dicho anticuerpo afecta además opcionalmente un ligando específico tal como, pero no limitado a, en donde dicho anticuerpo modula, disminuye, aumenta, antagoniza, agoniza, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, suprime y/o interfiere con por lo menos una actividad

de IL-12 o unión a la misma, o con una actividad del receptor de IL-12 o unión al mismo, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. Como un ejemplo no limitativo, un anticuerpo anti-IL-12 adecuado, porción o variante especificada del mismo de la presente invención puede unir por lo menos una molécula de IL-12, o

5 porciones, variantes o dominios especificados del mismo. Un anticuerpo anti-IL-12 adecuado, porción o variante especificada del mismo, puede afectar también opcionalmente por lo menos uno de actividad o función de IL-12 tal como, pero no limitada a, síntesis de ARN, ADN o proteínas, liberación de IL-12, señalización del receptor de IL-12, digestión de IL-12 de membrana,

10 actividad de IL-12 y producción y/o síntesis de IL-12.

Se pretende además que el término “anticuerpo” abarque anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones y variantes especificadas de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpo o que comprendan porciones de anticuerpos que imiten la estructura y/o función de un anticuerpo o

15 fragmento o porción especificado del mismo, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de los mismos. Fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno que se unen a una IL-12 de mamífero. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de unión a IL-12 o porciones del mismo incluyendo, pero no limitados a, fragmentos Fab (por

20 ejemplo, por digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, por digestión y reducción parcial con pepsina) y F(ab')<sub>2</sub> (por ejemplo, por digestión con pepsina), facb (por ejemplo, por digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión,

reducción parcial y reagregación por pepsina), Fv o scFv (por ejemplo, por medio de técnicas de biología molecular), son abarcados por la invención (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, citado anteriormente).

5        Dichos fragmentos pueden producirse mediante técnicas de  
digestión enzimática, de síntesis o recombinantes, como es sabido en la  
técnica y/o como se describe en la presente. Pueden producirse también  
anticuerpos en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpo  
en los cuales uno o más codones de detención han sido introducidos hacia el  
extremo 5' del sitio de detención natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen  
10    de combinación que codifique para una porción de cadena pesada  $F(ab')_2$  que  
incluya secuencias de ADN que codifiquen para el dominio  $C_{H1}$  y/o la región  
de gozne de la cadena pesada. Las varias porciones de anticuerpos pueden  
unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse  
como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

15        Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humano" se  
refiere a un anticuerpo en el cual sustancialmente cualquier parte de la  
proteína (por ejemplo, CDR, estructura, dominios  $C_L$ ,  $C_H$  (por ejemplo,  $C_{H1}$ ,  
 $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ), gozne, ( $V_L$ ,  $V_H$ )) es sustancialmente no inmunógena en humanos,  
con sólo cambios o variaciones de secuencia menores. Un "anticuerpo  
20    humano" puede ser también un anticuerpo que se derive de, o que coincida  
estrechamente con, secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal  
humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácido no  
codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal (por

22

ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Con frecuencia, esto significa que el anticuerpo humano es sustancialmente no inmunógeno en humanos. Se han clasificado anticuerpos humanos en grupos, con base en las

5 similitudes de su secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, mediante el uso de una búsqueda de similitud de secuencias, un anticuerpo con una secuencia lineal similar puede seleccionarse como un molde para crear un anticuerpo humano. Asimismo, anticuerpos diseñados de primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, conejillo de Indias,

10 hámster, y similares) y otros mamíferos, designan dichos anticuerpos específicos de especie, subgénero, género, subfamilia y familia. Además, los anticuerpos quiméricos de la invención pueden incluir cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones retienen o reducen opcionalmente y de preferencia la inmunogenicidad en humanos u otras

15 especies respecto a anticuerpos no modificados. De esta manera, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado.

Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano o célula procariótica o eucariótica que sea capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reordenados (por

20 ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena sencilla, puede comprender un péptido enlazador que no se encuentra en anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como dos a

aproximadamente ocho residuos de glicina u otro aminoácido, que une la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos enlazadores son de origen humano.

Pueden usarse también anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que sean anticuerpos monoclonales, de preferencia humanos o humanizados, que tengan especificidades de unión por cuando menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para por lo menos una proteína de IL-12, el otro es para cualquier otro antígeno. Métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual se hace usualmente mediante pasos de cromatografía de afinidad, es más bien problemática, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen, por ejemplo, en el documento WO 93/08829, patentes de E.U.A. Nos. 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819,

5582996, 5496549 y 4676980, y en los documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089, Traunecker *et al.*, EMBO J. 10: 3655 (1991), Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121: 210 (1986), cada una de estas citas siendo incorporada enteramente en la presente como referencia.

5                    Los anticuerpos anti-IL-12 (denominados también anticuerpos de IL-12) útiles en los métodos y las composiciones de la presente invención, pueden caracterizarse opcionalmente por alta afinidad de unión a la IL-12, y opcionalmente y de preferencia tienen baja toxicidad. En particular, un anticuerpo, fragmento o variante especificado de la invención, en donde los  
10    componentes individuales, tales como la región variable, región constante y estructura, individualmente y/o en conjunto, opcionalmente y de preferencia poseen baja inmunogenicidad, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que pueden usarse en la invención se caracterizan opcionalmente por su capacidad para tratar a pacientes por períodos extendidos con alivio  
15    mensurable de síntomas y toxicidad baja y/o aceptable. La inmunogenicidad baja o aceptable y/o la alta afinidad, así como otras propiedades adecuadas, pueden favorecer los resultados terapéuticos obtenidos. El término "baja inmunogenicidad" se define en la presente como el aumento de respuestas de HAHA, HACA o HAMA significativas en menos de aproximadamente 75%, o  
20    de preferencia menos de aproximadamente 50% de los pacientes tratados, y/o el aumento de bajos títulos en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, de preferencia menos de aproximadamente 100, medidas con un doble inmunoensayo de enzimas del antígeno) (Elliott, *et al.*,



*Lancet* 344: 1125-1127 (1994), cita incorporada enteramente en la presente como referencia). El término “baja inmunogenicidad” puede definirse también como la incidencia de niveles titulables de anticuerpos para el anticuerpo anti-IL-12 en pacientes tratados con anticuerpo anti-IL-12, como ocurre en menos de 25% de los pacientes tratados, de preferencia, en menos de 10% de los pacientes tratados con la dosis recomendada para el curso de terapia recomendado durante el período de tratamiento.

### Utilidad

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención, pueden usarse para la producción de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 o variante especificada del mismo, los cuales pueden usarse para medir o efectuar en una célula, tejido, órgano o animal (incluyendo mamíferos y humanos), para diagnosticar, monitorear, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de, por lo menos una condición por IL-12 seleccionada de, pero no limitada a, por lo menos una de una enfermedad o trastorno inmune, una enfermedad o trastorno cardiovascular, una enfermedad o trastorno infeccioso, maligno y/o neurológico, u otra condición relacionada con IL-12 conocida o especificada.

Dicho método puede comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o una composición farmacéutica que comprenda por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento, alivio, prevención o

reducción en síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad efectiva puede comprender una cantidad de aproximadamente 0.001 a 500 mg/kg por administración individual (por ejemplo, bolo), múltiple o continua, o para alcanzar una concentración en suero de 0.01-5000 µg/ml por administración individual, múltiple o continua, o cualquier escala o valor efectivo en la misma, como se hace y se determina usando métodos conocidos, como se describe en la presente o se conoce en las técnicas relevantes.

### Citas

Todas las publicaciones o patentes citadas en la presente, ya sea o no designadas específicamente, se incorporan enteramente en la presente como referencia, ya que muestran el estado de la técnica al momento de la presente invención, y/o proveen descripción y facilitación de la presente invención. Las publicaciones se refieren a cualquier publicación científica o de patente, o cualquier otra información disponible en el formato de cualquier medio, incluyendo todos los formatos registrados, electrónicos o impresos. Las siguientes referencias se incorporan enteramente en la presente como referencia: 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); y Colligan *et al.*, Current Protocols in Protein

Science, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001).

Anticuerpos de la presente invención – producción y generación

Por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención  
5 puede ser producido opcionalmente por una línea de células, una línea de  
células mixta, una célula inmortalizada o población clonal de células  
inmortalizadas, como es bien sabido en la técnica. Véase, 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  
10 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); y Colligan *et al.*, Current Protocols in Protein Science,  
John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001), cada una incorporada enteramente  
15 en la presente como referencia.

Anticuerpos humanos que son específicos para proteínas de IL-  
12 humanas, o fragmentos de las mismas, pueden ser producidos contra un  
antígeno inmunógeno adecuado, tal como proteína de IL-12 aislada y/o  
porción de la misma (incluyendo moléculas sintéticas, tales como péptidos  
20 sintéticos). Otros anticuerpos de mamífero específicos o generales pueden  
producirse en forma similar. La preparación de antígenos inmunógenos, y la  
producción de anticuerpos monoclonales, puede llevarse a cabo usando



cualquier técnica adecuada.

En una alternativa, se produce un hibridoma fusionando una línea de células inmortal adecuada (por ejemplo, una línea de células de mieloma tal como, pero no limitada a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, 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 heteromielomas, productos de fusión de las mismas, o cualquier célula o célula de fusión derivada de las mismas, o cualquier otra línea de células adecuada como es sabido en la técnica) (véase, por ejemplo, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com)., y similares), con células que producen anticuerpos tales como, pero no limitadas a, células aisladas o clonadas de bazo, sangre periférica, linfa, amígdala u otra célula inmune o célula B, o cualquier otra célula que exprese secuencias de CDR o de estructura o de región variable o constante de cadena ligera o pesada, como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de alga, procariótico, o de anfibio, insecto, reptil, pez, mamífero, roedor, equino, ovino, cabra, oveja, primate, eucariótico o genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplastos, ARNhn, ARNm, ARNt, de cadena sencilla, doble o triple, hibridado, y similares, o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente, y Colligan, Immunology, citado anteriormente, capítulo 2, citas incorporadas enteramente en la presente como referencia.

Pueden obtenerse también células que producen anticuerpos de la sangre periférica o, de preferencia, el bazo o los nódulos linfáticos, de humanos u otros animales adecuados que hayan sido inmunizados con el antígeno de interés. Cualquier otra célula hospedera adecuada puede usarse

5 también para la expresión del ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifique para un anticuerpo, fragmento o variante especificado del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y pueden clonarse mediante dilución

10 limitativa o distribución de células, u otros métodos conocidos. Las células que produzcan anticuerpos con la especificidad deseada, pueden seleccionarse mediante una prueba adecuada (por ejemplo, ELISA).

Pueden usarse otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida e incluyen, pero no están limitados

15 a, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una colección de proteínas o péptidos (por ejemplo, pero no limitada a, una colección de presentación visual de bacteriófagos, ribosomas, oligonucleótidos, ARN, ADNc, o similares; por ejemplo, como la disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Reino Unido; MorphoSys,

20 Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Escocia, Reino Unido; BioInvent, Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; e Ixsys. Véase, por ejemplo, los documentos EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883;

PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422;  
 PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443;  
 WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754;  
 (Scripps); WO96/13583, WO97/08320 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent);  
 5 WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989  
 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; y  
 PCT/US91/07149 (Ixsys); o péptidos o proteínas generados estocásticamente  
 - véase los documentos US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514,  
 5976862, WO 86/05803 y EP 590 689 (Ixsys, ahora Applied Molecular  
 10 Evolution (AME), cada uno incorporado enteramente en la presente como  
 referencia), o que dependen de la inmunización de animales transgénicos (por  
 ejemplo, ratones SCID; véase Nguyen *et al.*, Microbiol. Immunol. 41: 901-907  
 (1997); Sandhu *et al.*, Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95-118 (1996); y Eren *et al.*,  
 Immunol. 93: 154-161 (1998), cada una incorporada enteramente en la  
 15 presente como referencia, así como patentes y solicitudes relacionadas) que  
 son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como es  
 sabido en la técnica y/o como se describe en la presente. Dichas técnicas  
 incluyen, pero no están limitadas a, presentación visual de ribosomas (véase  
 Hanes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (mayo de 1997); y  
 20 Hanes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130-14135 (nov. de 1998));  
 tecnologías de producción de anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo,  
 método de anticuerpos seleccionados de linfocitos ("SLAM") (véase patente  
 de E.U.A. No. 5,627,052, Wen *et al.*, J. Immunol. 17: 887-892 (1987); y

Babcock *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996)); microgotas de gel y citometría de flujo (véase 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)); y 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., Amsterdam, Los Países Bajos (1988)).

Métodos para el diseño o humanización de anticuerpos humanos o no humanos pueden usarse también, y son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado o diseñado tiene uno o más residuos de aminoácido de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitada a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácido no de humano son reemplazados por residuos referidos con frecuencia como residuos “introducidos”, los cuales se toman típicamente de un dominio variable, constante u otro dominio “introducido”, de una secuencia conocida de humano.

Secuencias de inmunoglobulina humana conocida se describen, por ejemplo, en [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); [www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast); [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php); [www.kabatdatabase.com/top.html](http://www.kabatdatabase.com/top.html); [ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat](http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat); [www.sciquest.com](http://www.sciquest.com); [www.abcam.com](http://www.abcam.com); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);

- [www.public.iastate.edu/~pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html);  
[www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm);  
[www.hhmi.org/grants/lectoes/1996/vlab](http://www.hhmi.org/grants/lectoes/1996/vlab);  
[www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html);  
 5    [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html);                      [www.immunologylink.com](http://www.immunologylink.com);  
       [pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html);                      [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com);  
       [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody);                      [www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html); [www.biodesign.com](http://www.biodesign.com); [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org);  
       [www.biotech.ufl.edu](http://www.biotech.ufl.edu); [www.isac-net.org](http://www.isac-net.org); [baserv.uci.kun.nl/~jraats/linksl.html](http://baserv.uci.kun.nl/~jraats/linksl.html);  
 10    [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu);                      [www.mrc-cpe.cam.ac.uk](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk);  
       [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);                      [http://www.bioinf.org.uk/abs](http://http://www.bioinf.org.uk/abs);  
       [antibody.bath.ac.uk](http://antibody.bath.ac.uk);                      [www.unizh.ch](http://www.unizh.ch);                      [www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcgO7s](http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcgO7s);  
       [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html);                      [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html);  
 15    [www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html);  
       [www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html); [www.jerini.de](http://www.jerini.de); Kabat *et al.*,  
       Sequences of Proteins of immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983),  
       cada cita siendo incorporada enteramente en la presente como referencia.

Dichas secuencias introducidas pueden usarse para reducir la  
 20    inmunogenicidad, o para reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad,  
       activación, inactivación, avidéz, especificidad, vida media, o cualquier otra  
       característica adecuada, como es sabido en la técnica. En general, los  
       residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la

influencia de la unión al antígeno. Por consiguiente, las secuencias de CDR humanas o no humanas completas, o parte de las mismas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden reemplazarse con secuencias de humano u otros aminoácidos.

5                   Opcionalmente, pueden humanizarse también anticuerpos o pueden diseñarse anticuerpos humanos con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este propósito, pueden prepararse opcionalmente anticuerpos humanizados (o humanos) mediante un procedimiento de análisis de las secuencias precursoras y varios  
10 productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comercialmente, y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas de cómputo que ilustran y presentan visualmente estructuras conformacionales  
15 tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones visuales permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a  
20 su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse y combinarse residuos de estructura (FR) de las secuencias consenso e introducida, de modo que se logren las características deseadas del anticuerpo, tales como afinidad incrementada por el antígeno objetivo.

Además, el anticuerpo de IL-12 humano de la presente invención puede comprender una estructura de cadena ligera de la línea germinal humana. En modalidades particulares, la secuencia de cadena ligera de la línea germinal se selecciona de secuencias de VK humanas que incluyen,

5 pero no están limitadas a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 y O8. En ciertas modalidades, esta estructura de cadena ligera de la línea germinal humana se selecciona de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17,

10 V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6.

En otras modalidades, el anticuerpo de IL-12 humano de la presente invención puede comprender una estructura de cadena pesada de la

15 línea germinal humana. En modalidades particulares, esta estructura de cadena pesada de la línea germinal humana se selecciona de VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64,

20 VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 y VH7-81.

En modalidades particulares, la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada comprenden una región de estructura

o por lo menos una porción de una región de estructura (por ejemplo, conteniendo 2 o 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En ciertas modalidades, por lo menos FRL1, FRL2, FRL3 o FRL4 es completamente humana. En otras modalidades, por lo menos FRH1, FRH2, FRH3 o FRH4 es

5 completamente humana. En algunas modalidades, por lo menos FRL1, FRL2, FRL3 o FRL4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana), o comprende secuencias consenso humanas para la estructura particular (fácilmente disponibles en las fuentes de secuencias de Ig humana conocidas descritas anteriormente). En otras modalidades, por lo menos

10 FRH1, FRH2, FRH3 o FRH4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana), o comprende secuencias consenso humanas para la estructura particular. En modalidades preferidas, la región de estructura es una región de estructura completamente humana.

La humanización o el diseño de los anticuerpos de la presente

15 invención pueden llevarse a cabo usando cualquier método conocido tal como, pero no limitado a, los que se describen en Winter (Jones *et al.*, Nature 321: 522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323 (1988); Verhoeven *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.

20 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151: 2623 (1993), patentes de E.U.A. Nos. 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; y 4816567; y documentos PCT/: US98/16280,

US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430 y EP 229246, citas que se incorporan enteramente en la presente como referencia, incluyendo referencias citadas en las mismas.

5                    En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región Fc alterada (por ejemplo, mutada). Por ejemplo, en algunas modalidades, la región Fc ha sido alterada para reducir o mejorar las funciones efectoras del anticuerpo. En algunas modalidades, la región Fc es un isotipo seleccionado de IgM, IgA, IgG, IgE, u otro isotipo. En forma alternativa o adicionalmente,  
10 puede ser útil combinar modificaciones de aminoácidos con una o más de otras modificaciones de aminoácidos que alteren la unión a C1q y/o la función de citotoxicidad dependiente del complemento de la región Fc de una molécula de unión a IL-12. El polipéptido de partida de interés particular puede ser uno que se una a C1q, y exhiba citotoxicidad dependiente del  
15 complemento (CDC). Polipéptidos con actividad de unión a C1q preexistente, teniendo además opcionalmente la capacidad de mediar la CDC pueden ser modificados, de modo que una de estas actividades, o ambas, sean mejoradas. Modificaciones de aminoácidos que alteran C1q y/o modifican su función de citotoxicidad dependiente del complemento se describen, por  
20 ejemplo, en el documento WO0042072, el cual se incorpora en la presente como referencia.

                    Como se describió anteriormente, puede diseñarse una región Fc del anticuerpo de IL-12 humano de la presente invención con función

37

efectora alterada, por ejemplo, modificando la unión a C1q y/o la unión a Fc $\gamma$ R, y cambiando de esta manera la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC). Las “funciones efectoras” son responsables de activar o disminuir una actividad biológica (por ejemplo, en un sujeto). Ejemplos de funciones efectoras incluyen, pero no están limitadas a, unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; subregulación de receptores de superficie de la célula (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras pueden requerir que la región Fc sea combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo), y puede evaluarse usando varias pruebas (por ejemplo, pruebas de unión a Fc, pruebas de ADCC, pruebas de CDC, etc.).

Por ejemplo, puede generarse una región Fc variante del anticuerpo de IL-12 humano con unión a C1q mejorada y unión a Fc $\gamma$ RIIIb mejorada (por ejemplo, teniendo actividad de ADCC mejorada y actividad de CDC mejorada). En forma alternativa, si se desea que la función efectora sea reducida o removida, puede diseñarse una región Fc variante con actividad de CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras modalidades, sólo una de estas actividades puede ser incrementada y, opcionalmente, también la otra actividad puede ser reducida (por ejemplo, para generar una variante de la región Fc con actividad de ADCC mejorada, pero actividad de CDC reducida, y viceversa).

Pueden introducirse también mutaciones de Fc para alterar su

interacción con el receptor Fc neonatal (FcRn) y mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Se ha descrito una colección de variantes de Fc humanas con unión mejorada a FcRn (Shields, *et al.*, (2001)). Se ha realizado también el mapeo de alta resolución del sitio de unión en la IgG1 humana para FcγRI, 5 FcγRII, FcγRIII y FcRn, y el diseño de variantes de IgG1 con unión mejorada a FcγR, (véase J. Biol. Chem. 276: 6591-6604).

Otro tipo de sustitución de aminoácidos sirve para alterar el patrón de glucosilación de la región Fc del anticuerpo de IL-12 humano. La glucosilación de una región Fc es típicamente N-enlazada u O-enlazada. El 10 término N-enlazada se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. El término glucosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque pueden usarse también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Las 15 secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a las secuencias peptídicas de la cadena lateral de asparagina son asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido, salvo prolina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias peptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación 20 potencial.

El patrón de glucosilación puede alterarse, por ejemplo, deletando uno o más sitios de glucosilación presentes en el polipéptido, y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no estén presentes en el

polipéptido. La adición de sitios de glucosilación a la región Fc de un anticuerpo de IL-12 humano se logra convenientemente, alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glucosilación N-enlazados).

- 5 Un ejemplo de variante de glucosilación tiene una sustitución de aminoácido del residuo Asn 297 de la cadena pesada. La alteración puede hacerse también por la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido original (para sitios de glucosilación O-enlazados). Además, un cambio de Asn 297 a Ala puede remover uno de los
- 10 sitios de glucosilación.

En ciertas modalidades, el anticuerpo de IL-12 humano de la presente invención se expresa en células que expresan beta (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III), de modo que GnT III añade GlcNAc al anticuerpo de IL-12 humano. Métodos para producir anticuerpos de dicha

15 forma se proveen en los documentos WO/9954342, WO/03011878, publicación de patente 20030003097A1, y en Umana *et al.*, Nature Biotechnology, 17: 176-180, feb. de 1999; citas que se incorporan específicamente en su totalidad en la presente como referencia.

El anticuerpo anti-IL-12 puede generarse también opcionalmente

20 inmunizando un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano, y similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se describe en la presente y/o como es sabido en la técnica. Células que producen un anticuerpo anti-IL-12 humano pueden aislarse de

dichos animales, y pueden immortalizarse usando métodos adecuados, tales como los métodos que se describen en la presente.

Ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que se unen a antígenos humanos, pueden producirse mediante métodos conocidos (por ejemplo, pero no limitados a, los métodos descritos en las patentes de E.U.A. Nos. 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 y 5,789,650 expedidas 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 E.U.A. No. 5,545,807, 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), Méndez *et al.*, *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20(23): 6287-6295 (1992), Tuaillon *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), citas que se incorporan enteramente en la presente como referencia). En general, estos ratones comprenden por lo menos un transgen que comprende ADN de por lo menos un locus de inmunoglobulina humana que es reordenado funcionalmente, o que puede sufrir reordenamiento funcional. Los loci de inmunoglobulina endógenos en

dichos ratones, pueden ser desorganizados o deletados para suprimir la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

La selección de anticuerpos para unión específica a proteínas o  
5 fragmentos similares, puede lograrse convenientemente usando colecciones de presentación visual de péptidos. Este método incluye la selección de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseada. La selección de anticuerpos de colecciones de presentación visual de péptidos, es bien conocida en la técnica. Las  
10 secuencias de péptidos presentadas visualmente pueden tener de 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, con frecuencia de 5 a 100 aminoácidos de longitud, y con frecuencia de aproximadamente 8 a 25 aminoácidos de longitud. Además de métodos directos de síntesis química para la generación de colecciones de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN  
15 recombinante. Un tipo incluye la presentación visual de una secuencia de péptidos sobre la superficie de una célula o bacteriófago. Cada célula o bacteriófago contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de péptidos particular presentada visualmente. Dichos métodos se describen en la publicación de patente del PCT Nos. 91/17271, 91/18980,  
20 91/19818 y 93/08278.

Otros sistemas para la generación de colecciones de péptidos, tienen aspectos de síntesis química *in vitro* y métodos recombinantes. Véase la publicación de patente del PCT Nos. 92/05258, 92/14843 y 96/19256. Véase

también las patentes de E.U.A. Nos. 5,658,754 y 5,643,768. Equipos de selección y vectores y colecciones de presentación visual de péptidos, están disponibles comercialmente de proveedores tales como Invitrogen (Carlsbad, CA) y Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido). Véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260 y 5856456, asignadas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698 y 5837500, asignadas a Dyax, 5427908 y 5580717, asignadas a Affymax; 5885793, asignada a Cambridge antibody Technologies; 5750373, asignada a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493 y 5698417, asignadas a Xoma, Colligan, citado anteriormente; Ausubel, citado anteriormente; o Sambrook, citado anteriormente, cada una de las patentes y publicaciones anteriores, siendo incorporada enteramente en la presente como referencia.

Pueden prepararse también anticuerpos de la presente invención, usando por lo menos un ácido nucleico que codifique para anticuerpos anti-IL-12 para proveer animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que produzcan dichos anticuerpos en su leche. Dichos animales pueden proveerse usando métodos conocidos. Véase, por ejemplo, pero no limitadas a, las patentes de E.U.A. Nos. 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489, y similares, cada una de las cuales se incorpora enteramente en la presente como referencia.

Pueden prepararse adicionalmente anticuerpos de la presente invención, usando por lo menos un ácido nucleico que codifique para

anticuerpos anti-IL-12 para proveer plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero no limitadas a, tabaco y maíz) que produzcan dichos anticuerpos, porciones o variantes especificadas de los mismos, en las partes de la planta o en células cultivadas de las mismas. Como un ejemplo

5 no limitativo, se han usado con éxito hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes, para proveer grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer *et al.*, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 (1999), y referencias citadas en la misma. Asimismo, se ha usado maíz transgénico

10 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. Véase, por ejemplo, Hood *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 (1999), y referencias citadas en la misma. Se han producido también anticuerpos en grandes cantidades a partir

15 de semillas de plantas transgénicas, incluyendo fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv's), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de papa. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.*, Plant Mol. Biol. 38: 101-109 (1998), y referencias citadas en la misma. De esta manera, pueden producirse también anticuerpos de la presente invención usando

20 plantas transgénicas, de acuerdo a métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (octubre de 1999), Ma *et al.*, Trends Biotechnol. 13: 522-7 (1995); Ma *et al.*, Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); y Whitelam *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944

(1994); y referencias citadas en las mismas. Cada una de las referencias anteriores, se incorpora enteramente en la presente como referencia.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a la IL-12 de humano con una amplia gama de afinidades ( $K_D$ ). En una modalidad preferida, por lo menos un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención puede unirse opcionalmente a la IL-12 de humano con alta afinidad. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano puede unirse a la IL-12 de humano con una  $K_D$  igual a o menor que aproximadamente  $10^{-7}$  M tal como, pero no limitada a, 0.1-9.9 (o cualquier escala o valor en la misma)  $\times 10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ , o cualquier escala o valor en la misma.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier método conocido. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions", en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); y métodos descritos en las mismas). La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones (por ejemplo, concentración de sales, pH). De esta manera, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ ) se hacen de preferencia con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un regulador de pH estandarizado, tal como el regulador de pH que se describe en la presente.

Moléculas de ácido nucleico

Mediante el uso de la información provista en la presente, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican para por lo menos 70 a 100% de los aminoácidos contiguos de por lo menos una de las regiones CDR o variables de cadena ligera o pesada de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, entre otras secuencias descritas en la presente, fragmentos especificados, variantes o secuencias consenso de las mismas, o un vector depositado que comprende por lo menos una de estas secuencias, una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifique para por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, puede obtenerse usando los métodos descritos en la presente o como es sabido en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en la forma de ARN, tales como ARNm, ARNhn, ARNt, o cualquier otra forma, o en la forma de ADN que incluye, pero no está limitada a, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido en forma sintética, o cualquier combinación de las mismas. El ADN puede ser de triple cadena, doble cadena o de cadena sencilla, o cualquier combinación de las mismas. Cualquier porción de por lo menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificante, conocida también como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, referida también como la cadena antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprendan un

marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitadas a, por lo menos una porción especificada de por lo menos una CDR, tales como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de por lo menos una cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1-3) o cadena ligera (por ejemplo, 5 SEQ ID NOS: 4-6); moléculas de ácido nucleico que comprendan la secuencia codificante para un anticuerpo anti-IL-12, o región variable (por ejemplo, regiones variables de cadena pesada y ligera de SEQ ID NOS: 7 y 8); y moléculas de ácido nucleico que comprendan una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la 10 degeneración del código genético, codifican aún para por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 como se describe en la presente y/o como es sabido en la técnica. De hecho, el código genético es bien conocido en la técnica. De esta manera, sería de rutina para el experto en la técnica generar dichas variantes de ácido nucleico degeneradas que codifican para anticuerpos anti- 15 IL-12 específicos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, citado anteriormente, y dichas variantes de ácido nucleico se incluyen en la presente invención. Ejemplos no limitativos de moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, incluyen ácidos nucleicos que codifican para HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, 20 respectivamente.

Como se indica en la presente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo anti-IL-12 pueden incluir, pero no están limitadas a, aquellas

42

que codifican para la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo, por sí mismas; la secuencia codificante para el anticuerpo entero o una porción del mismo; la secuencia codificante para un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia

5 codificante de por lo menos un péptido de fusión o guía de señal, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, tales como por lo menos un intrón, junto con secuencias no codificantes adicionales que incluyen, pero no están limitadas a, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas no traducidas que desempeñan una función

10 en la transcripción, procesamiento de ARN mensajero, incluyendo señales de empalme y poliadenilación (por ejemplo, unión a ribosomas y estabilidad del ARN mensajero); una secuencia codificante adicional que codifica para aminoácidos adicionales, tales como los que proveen funcionalidades adicionales. De esta manera, la secuencia que codifica para un anticuerpo

15 puede fusionarse a una secuencia de marcación, tal como una secuencia que codifique para un péptido que facilite la purificación del anticuerpo fusionado que comprenda un fragmento o porción de anticuerpo.

Polinucleótidos que hibridan selectivamente con un

20 polinucleótido como se describe en la presente

La presente invención provee ácidos nucleicos aislados que hibridan bajo condiciones de hibridación selectiva con un polinucleótido descrito en la presente. De esta manera, los polinucleótidos de esta

modalidad pueden usarse para el aislamiento, detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para identificar, aislar o amplificar clones de longitud parcial o completa en una colección depositada. En algunas modalidades, los polinucleótidos son secuencias de ADNc o genómicas aisladas, o de otra manera complementarias a, un ADNc de una colección de ácido nucleico de humano o mamífero.

De preferencia, la colección de ADNc comprende por lo menos 80% de secuencias de longitud completa, de preferencia por lo menos 85 ó 90% de secuencias de longitud completa, y más preferiblemente por lo menos 95% de secuencias de longitud completa. Las colecciones de ADNc pueden normalizarse para aumentar la representación de secuencias raras. Se usan típicamente, pero no exclusivamente, condiciones de hibridación de severidad baja o moderada con secuencias que tengan una identidad de secuencias reducida respecto a secuencias complementarias. Pueden usarse opcionalmente condiciones de severidad moderada y alta para secuencias de mayor identidad. Las condiciones de baja severidad permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen aproximadamente 70% de identidad de secuencias, y pueden usarse para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Opcionalmente, los polinucleótidos de esta invención codificarán para por lo menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos de esta invención

abarcen secuencias de ácido nucleico que pueden usarse para hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente; Colligan, citado anteriormente, cada uno incorporado enteramente en la presente como  
5 referencia.

### Construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden producirse usando, (a) métodos recombinantes, (b) técnicas de síntesis, (c)  
10 técnicas de purificación, o combinaciones de los mismos, como es bien sabido en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, puede insertarse un sitio de clonación múltiple que comprenda uno o más sitios  
15 de endonucleasa de restricción en el ácido nucleico que facilite el aislamiento del polinucleótido. Asimismo, pueden insertarse secuencias traducibles que faciliten el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia de marcador de hexa-histidina provee un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente  
20 invención, excluyendo la secuencia codificante, es opcionalmente un vector, adaptador o enlazador para la clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente invención.

Pueden añadirse secuencias adicionales a dichas secuencias de

expresión y/o clonación para optimizar su función en clonación y/o expresión, para facilitar 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. (Véase, 5 por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente; o Sambrook, citado anteriormente).

#### Métodos recombinantes para la construcción de ácidos nucleicos

Las composiciones de ácido nucleico aisladas de esta invención, tales como ARN, ADNc, ADN genómico, o cualquier combinación de los 10 mismos, pueden obtenerse de fuentes biológicas usando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, bajo condiciones severas, con los polinucleótidos de la presente invención, se usan para identificar la secuencia deseada en una colección de ADN genómico o de 15 ADNc. El aislamiento de ARN, y la construcción de colecciones de ADNc y ADN genómico, son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente; o Sambrook, citado anteriormente).

#### Métodos para la selección y el aislamiento de ácidos nucleicos

20 Puede seleccionarse una colección genómica o de ADNc, usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tal como se describe en la presente. Pueden usarse sondas que hibriden con secuencias de ADNc o ADN genómico para aislar genes

51

homólogos en el mismo organismo o diferentes organismos. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse en la prueba varios grados de severidad de hibridación; y la hibridación o el medio de lavado pueden ser severos. Puesto que las condiciones para la hibridación llegan a ser más severas, debe haber un

5 mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que ocurra la formación del dúplex. El grado de severidad puede controlarse mediante uno o más de temperatura, concentración iónica, pH y la presencia de un solvente parcialmente desnaturizante, tal como formamida. Por ejemplo, la severidad de hibridación se hace variar convenientemente cambiando la polaridad de la

10 solución de reactivos, por ejemplo, a través de la manipulación de la concentración de formamida dentro de la escala de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencias) requerido para la unión detectable, variará de acuerdo con la severidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente de 100% ó

15 70-100%, o cualquier escala o valor en la misma. Sin embargo, debe entenderse que pueden compensarse variaciones de secuencia menores en las sondas e iniciadores, reduciendo la severidad del medio de lavado y/o la hibridación.

Métodos de amplificación de ARN o ADN son bien conocidos en la técnica y pueden usarse de conformidad con la presente invención sin

20 experimentación indebida, con base en la enseñanza y guía presentadas en la presente.

Métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no están limitados a, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y procedimientos

de amplificación relacionados (véase, por ejemplo, las patentes de E.U.A. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, a Mullis, *et al.*; 4,795,699 y 4,921,794 a Tabor, *et al.*; 5,142,033 a Innis; 5,122,464 a Wilson, *et al.*; 5,091,310 a Innis; 5,066,584 a Gyllensten, *et al.*; 4,889,818 a Gelfand, *et al.*; 5 4,994,370 a Silver, *et al.*; 4,766,067 a Biswas; y 4,656,134 a Ringold), y amplificación mediada por ARN que usa ARN antisentido para la secuencia objetivo como molde para la síntesis de ADN de doble cadena (patente de E.U.A. No. 5,130,238 a Malek, *et al.*, con el nombre comercial NASBA), referencias cuyo contenido entero se incorpora en la presente como 10 referencia. (Véase, por ejemplo, Ausubel, citado anteriormente; o Sambrook, citado anteriormente).

Por ejemplo, puede usarse tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y genes relacionados, directamente a partir de ADN 15 genómico o colecciones de ADNc. PCR y otros métodos de amplificación *in vitro* pueden ser también útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas que se van a expresar, para producir ácidos nucleicos para su uso como sondas para la detección de la presencia del ARN mensajero deseado en muestras, para secuenciación de ácido nucleico, o 20 para otros propósitos. Ejemplos de técnicas suficientes que llevan a los expertos en la técnica a través de métodos de amplificación *in vitro*, se encuentran en Berger, citado anteriormente, Sambrook, citado anteriormente, y Ausubel, citado anteriormente, así como Mullis, *et al.*, patente de E.U.A. No. 4,683,202 (1987); e

Innis, *et al.*, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Equipos disponibles comercialmente para amplificación mediante PCR genómica, se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el equipo de PCR genómica Advantage-GC  
5 (Clontech). Además, por ejemplo, puede usarse la proteína 32 del gen de T4 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de productos de PCR largos.

#### Métodos de síntesis para la construcción de ácidos nucleicos

10 Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden prepararse también mediante síntesis química directa usando métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, citado anteriormente). La síntesis química produce en general un oligonucleótido de cadena sencilla, el cual puede convertirse en ADN de doble cadena mediante hibridación con una secuencia  
15 complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como molde. El experto en la técnica reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN puede limitarse a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

20

#### Cassettes de expresión recombinante

La presente invención provee además cassettes de expresión recombinante que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Una

secuencia de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, un ADNc o una secuencia genómica que codifique para un anticuerpo de la presente invención, puede usarse para construir un cassette de expresión recombinante que pueda introducirse en por lo menos una célula hospedera deseada. Un

5 cassette de expresión recombinante comprenderá típicamente un polinucleótido de la presente invención enlazado operablemente a secuencias reguladoras de inicio de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula hospedera deseada. Pueden usarse promotores heterólogos y no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos

10 nucleicos de la presente invención.

En algunas modalidades, pueden introducirse ácidos nucleicos aislados que sirvan como promotor, intensificador u otros elementos en la posición adecuada (hacia el extremo 5', hacia el extremo 3' o en intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención, para

15 sobrerregular o subregular la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, promotores endógenos pueden ser alterados *in vivo* o *in vitro* mediante mutación, delección y/o sustitución.

#### Vectores y células hospederas

20 La presente invención se refiere también a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, células hospederas que son diseñadas genéticamente con los vectores recombinantes, y la producción de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 mediante técnicas



recombinantes, como es bien sabido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, citado anteriormente; Ausubel, *et al.*, citado anteriormente, cada una incorporada enteramente en la presente como referencia.

Los polinucleótidos pueden unirse opcionalmente a un vector  
5 que contenga un marcador seleccionable para propagación en un hospedero. En general, se introduce un vector de plásmido 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, puede empacarse *in vitro* usando una línea de células de empacamiento adecuada, y puede transducirse entonces en células  
10 hospederas.

La inserción de ADN debe ser enlazada operablemente a un promotor adecuado. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para inicio de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción. La porción codificante de los  
15 transcritos maduros expresada por las construcciones, incluirá de preferencia un codón de inicio de la traducción al inicio, y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) posicionado adecuadamente en el extremo del ARN mensajero que va a ser traducido, siendo preferidos UAA y UAG para la expresión de células de mamífero o eucarióticas.

20 Los vectores de expresión incluirán de preferencia pero opcionalmente, por lo menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen, por ejemplo, pero no están limitados a, genes de resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, patentes de E.U.A. Nos.

4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; y 5,179,017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico o glutamina sintetasa (GS, patentes de E.U.A. Nos. 5,122,464; 5,770,359; y 5,827,739) para cultivo de células eucarióticas, y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para el

5 cultivo en *E. coli* y otras bacterias o procariontes (las patentes anteriores siendo incorporadas enteramente en la presente como referencia). Condiciones y medios de cultivo adecuados para las células hospederas descritas anteriormente, se conocen en la técnica. Vectores adecuados serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. La introducción de una

10 construcción de vector en una célula hospedera puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrán, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos conocidos. Dichos métodos se describen en la técnica, tal como en Sambrook, citado anteriormente, capítulos 1-4 y 16-18; y

15 Ausubel, citado anteriormente, capítulos 1, 9, 13, 15 y 16.

Por lo menos un anticuerpo de la presente invención puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, puede añadirse una región de

20 aminoácidos adicionales, en particular aminoácidos cargados al N-terminal de un anticuerpo, para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedera, durante la purificación, o durante el manejo y almacenamiento subsecuentes. Asimismo, pueden añadirse porciones de péptidos a un

anticuerpo de la presente invención para facilitar la purificación. Dichas regiones pueden removerse antes de la preparación final de un anticuerpo o por lo menos un fragmento del mismo. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como en Sambrook, citado  
5 anteriormente, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; y Ausubel, citado anteriormente, capítulos 16, 17 y 18.

Los expertos en la técnica están bien informados de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica para una proteína de la presente invención. En forma  
10 alternativa, pueden expresarse ácidos nucleicos de la presente invención en una célula hospedera, por activación (mediante manipulación) en una célula hospedera que contenga ADN endógeno que codifique para un anticuerpo de la presente invención. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de E.U.A. Nos. 5,580,734,  
15 5,641,670, 5,733,746 y 5,733,761, incorporadas enteramente en la presente como referencia.

Ilustrativas de cultivos de células útiles para la producción de los anticuerpos, porciones o variantes especificadas de los mismos, son células de mamífero. Los sistemas de células de mamífero estarán con frecuencia en la  
20 forma de monocapas de células, aunque pueden usarse también suspensiones de células de mamífero o biorreactores. Muchas líneas de células hospederas adecuadas capaces de expresar proteínas glucosiladas intactas se han desarrollado en la técnica, e incluyen las líneas de células COS-1 (por ejemplo,

CRL 1650 de ATCC), COS-7 (por ejemplo, CRL-1651 de ATCC), HEK293, BHK21 (por ejemplo, CRL-10 de ATCC), CHO (por ejemplo, CRL 1610 de ATCC) y BSC-1 (por ejemplo, CRL-26 de ATCC), células Cos-7, células CHO, células hep G2, células P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, células HeLa, y  
 5 similares, las cuales están fácilmente disponibles de, por ejemplo, The American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Células hospederas incluyen células de origen linfoide, tales como células de mieloma y linfoma. Células hospederas son células P3X63Ag8.653 (número de acceso de ATCC CRL-1580) y células SP2/0-Ag14 (número de acceso de ATCC  
 10 CRL-1851). En una modalidad particularmente preferida, la célula recombinante es una célula P3X63Ab8.653 o una célula SP2/0-Ag14.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de la expresión tales como, pero no limitadas a, un origen de replicación; un promotor (por ejemplo,  
 15 promotores temprano o tardío del SV40, el promotor del CMV (patentes de E.U.A. Nos. 5,168,062 y 5,385,839), el promotor tk del HSV, un promotor de pgk (fosfoglicerato cinasa), un promotor de EF-1 alfa (patente de E.U.A. No. 5,266,491), por lo menos un promotor de inmunoglobulina humana; un intensificador y/o sitios de información de procesamiento, tales como sitios de  
 20 unión a ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición grande de poli A del antígeno T del SV40), y secuencias de terminación de la transcripción. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, citado anteriormente; y Sambrook, *et al.*, citado anteriormente. Otras células

útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o están disponibles, por ejemplo, de The American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)), u otras fuentes comerciales o conocidas.

5                    Cuando se usan células hospederas eucarióticas, se incorporan típicamente en el vector secuencias de poliadenilación o secuencias de terminación de la transcripción. Un ejemplo de una secuencia de terminación es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento de bovino. Pueden incluirse también secuencias para el empalme preciso del transcrito. Un  
10                    ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 del SV40 (Sprague, *et al.*, J. Virol. 45: 773-781 (1983)). Además, secuencias génicas que controlan la replicación en las células hospederas pueden incorporarse en el vector, como es sabido en la técnica.

#### 15                    Purificación de un anticuerpo

                     Puede recuperarse y purificarse un anticuerpo anti-IL-12 de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos que incluyen, pero no están limitados a, purificación de proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio  
20                    aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. Puede usarse también cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("CLAR") para la purificación. Véase, 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 y 10, citas que se incorporan enteramente en la presente como referencia.

5                    Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados en forma natural, productos de procedimientos de síntesis química y productos obtenidos mediante técnicas recombinantes de un hospedero eucariótico que incluye, por ejemplo, células de levadura, planta superior, insecto y mamífero. Dependiendo del hospedero usado en un procedimiento  
10 de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede ser glucosilado, o puede no ser glucosilado, siendo de preferencia glucosilado. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook, citado anteriormente, secciones 17.37-17.42; Ausubel, citado anteriormente, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein  
15 Science, citado anteriormente, capítulos 12 a 14, todas estas citas siendo incorporadas enteramente en la presente como referencia.

#### Anticuerpos anti-IL-12

Un anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la presente  
20 invención, incluye cualquier molécula que contenga proteínas o péptidos que comprendan por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitada a, por lo menos una porción de unión a ligando (LBP) tal como, pero no limitada a, una región determinante de

complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera, o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región de estructura (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, FR4 o fragmento de las mismas, que comprenda además opcionalmente por lo menos una sustitución, inserción o delección), una región constante de cadena pesada o cadena ligera (por ejemplo, comprendiendo por lo menos uno de CH1, gozne1, gozne2, gozne3, gozne4, CH2, CH3, o fragmento de las mismas, que comprenda además opcionalmente por lo menos una sustitución, inserción o delección), o cualquier porción de la misma, que pueda incorporarse en un anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo de la invención puede incluir o puede derivarse de cualquier mamífero tal 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.

Los anticuerpos aislados de la presente invención comprenden secuencias de aminoácidos de un anticuerpo descritas en la presente, codificadas por algún polinucleótido adecuado, o algún anticuerpo aislado o preparado. De preferencia, el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno une la IL-12 de humano y, de esta manera, neutraliza parcialmente o sustancialmente por lo menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo, o porción o variante especificada del mismo, que neutraliza parcialmente o de preferencia sustancialmente por lo menos una actividad biológica de por lo menos una proteína de IL-12 o fragmento de la misma, puede unir la proteína o el fragmento e inhibir de esta manera actividades

mediadas a través de la unión de la IL-12 al receptor de la IL-12, o a través de otros mecanismos mediados o dependientes de la IL-12. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de IL-12, por aproximadamente 20-  
5 120%, de preferencia por cuando menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% o más, dependiendo de la prueba. La capacidad de un anticuerpo anti-IL-12 para inhibir una actividad dependiente de IL-12, se evalúa de preferencia mediante por lo menos una prueba adecuada del receptor o proteína de IL-12, como se  
10 describe en la presente y/o como es sabido 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 modalidad, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada de IgG o fragmento definido de la misma, por ejemplo, por lo menos uno de los  
15 isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ). Pueden prepararse anticuerpos de este tipo usando un ratón transgénico u otro mamífero no humano transgénico que comprenda por lo menos transgenes de una cadena ligera humana (por ejemplo, IgG, IgA e IgM), como se describe en la presente y/o como es sabido en la técnica. En otra modalidad, el anticuerpo  
20 humano de IL-12 anti-humano comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Por lo menos un anticuerpo de la invención une por lo menos un epítipo especificado específico para por lo menos una proteína de IL-12,

subunidad, fragmento, porción, o cualquier combinación del mismo. El epítope (por lo menos uno) puede comprender por lo menos una región de unión a anticuerpo que comprende por lo menos una porción de la proteína, cuyo epítope comprende de preferencia por lo menos una porción extracelular, soluble, hidrofílica, externa o citoplásmica de la proteína. El epítope especificado (por lo menos uno) puede comprender cualquier combinación de por lo menos una secuencia de aminoácidos de por lo menos 1 a 3 aminoácidos para la porción especificada entera de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 9, por ejemplo, los residuos de aminoácido 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62.

En general, el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno de la presente invención, comprenderá una región de unión al antígeno que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) humana o variante de por lo menos una región variable de cadena pesada, y por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) humana o variante de por lo menos una región variable de cadena ligera. Las secuencias de CDR pueden derivarse de secuencias de la línea germinal humana, o pueden igualar estrechamente secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, pueden usarse las CDRs de una colección de síntesis derivada de las CDRs no humanas originales. Estas CDRs pueden formarse por incorporación de sustituciones conservativas de la secuencia no humana original. Como un ejemplo no limitativo, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o variante

- puede comprender por lo menos una de las CDR3 de cadena pesada que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 1-3, y/o una CDR3 de cadena ligera que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 4-6. En
- 5 una modalidad particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprenda por lo menos una porción de por lo menos una CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tenga la secuencia de aminoácidos de las CDRs 1, 2 y/o 3 correspondientes (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3). En otra modalidad
- 10 particular, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o variante puede tener una región de unión al antígeno que comprenda por lo menos una porción de por lo menos una CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tenga la secuencia de aminoácidos de las CDRs, 1, 2 y/o 3 correspondientes.
- 15 Dichos anticuerpos pueden prepararse uniendo químicamente las varias porciones (por ejemplo, CDR, estructura) del anticuerpo, usando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifique para el anticuerpo usando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante, o usando cualquier otro
- 20 método adecuado.

El anticuerpo anti-IL-12 puede comprender por lo menos una región de una región variable de cadena ligera o pesada que tenga una secuencia de aminoácidos definida. Por ejemplo, en una modalidad preferida,

6

el anticuerpo anti-IL-12 comprende por lo menos una región de por lo menos una región variable de cadena pesada, teniendo opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y/o por lo menos una región variable de cadena ligera, teniendo opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Los anticuerpos que se unen a la IL-12 de humano y que comprenden una región variable de cadena ligera o cadena pesada definida, pueden prepararse usando métodos adecuados, tales como presentación visual de fagos (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol. Med* 1(5): 863-868 (1998)), o métodos que usen animales transgénicos, como es sabido en la técnica y/o como se describe en la presente. Por ejemplo, puede inmunizarse a un ratón transgénico que comprenda un transgen de cadena pesada de inmunoglobulina humana reordenado funcionalmente, o un transgen que comprenda ADN de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina humana, que pueda sufrir reordenamiento funcional, con una IL-12 de humano o un fragmento del mismo, para inducir la producción de anticuerpos. Si se desea, pueden aislarse células que produzcan anticuerpos, y pueden prepararse hibridomas u otras células que produzcan anticuerpos inmortalizados, como se describe en la presente y/o como es sabido en la técnica. En forma alternativa, el anticuerpo, porción o variante especificada del mismo, puede expresarse usando el ácido nucleico codificante o una porción del mismo en una célula hospedera adecuada.

La invención se refiere también a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, cadenas de inmunoglobulina y CDRs que comprenden

aminoácidos en una secuencia que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos descrita en la presente. De preferencia, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno y anticuerpos que comprenden dichas cadenas o CDRs, pueden unir la IL-12 de humano con alta afinidad (por ejemplo,  $K_D$  menor que o igual a aproximadamente  $10^{-9}$  M). Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a las secuencias descritas en la presente, incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservativas de aminoácidos, así como deleciones y/o inserciones de aminoácidos. Una sustitución conservativa de aminoácidos se refiere al reemplazo de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, carácter hidrofóbico/carácter hidrofílico) que son similares a las del primer aminoácido. Sustituciones conservativas incluyen el reemplazo de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (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.

## 20 Códigos de aminoácidos

Los aminoácidos que constituyen los anticuerpos anti-IL-12 de la presente invención, se abrevian con frecuencia. Las designaciones de los aminoácidos pueden indicarse designando el aminoácido por su código de

una sola letra, su código de tres letras, nombre, o codones de tres nucleótidos, como es bien sabido en la técnica (véase Alberts, B., *et al.*, Molecular Biology of The Cell, 3a. ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

|    |                          |                       |                 |                              |                    |
|----|--------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------------|--------------------|
| 5  | Código de una sola letra | Código de tres letras | Nombre          | Codones de tres nucleótidos  |                    |
|    | A                        | Ala                   | Alanina         | GCA, GCC, GCG, GCU           |                    |
|    | C                        | Cys                   | Cisteína        | UGC, UGU                     |                    |
|    | D                        | Asp                   | Acido aspártico | GAC, GAU                     |                    |
|    | E                        | Glu                   | Acido glutámico | GAA, GAG                     |                    |
| 10 | 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                   | Asparagina      | AAC, AAU                     |                    |
|    | 15                       | 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           |                    |
| 20 |                          | 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, ya sea de

mutaciones naturales o manipulación humana, como se especifica en la presente.

El número de sustituciones de aminoácidos que el experto en la técnica haría depende de muchos factores, que incluyen los descritos  
5 anteriormente. Hablando en términos generales, el número de sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos para algún anticuerpo anti-IL-12 determinado, fragmento o variante del mismo, no será mayor 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 1 a 30, o cualquier escala o valor en la misma, como se especifica en la presente.

10 Los aminoácidos en un anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención que son esenciales para función, pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis por exploración de alanina (véase, por ejemplo, Ausubel, citado  
15 anteriormente, capítulos 8 y 15; Cunningham y Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones de alanina individuales en cualquier residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se ponen a prueba entonces para actividad biológica tal como, pero no limitada a, por lo menos una actividad neutralizante de IL-12. Pueden identificarse  
20 también sitios que son críticos para la unión del anticuerpo, mediante análisis estructural tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcación por fotoafinidad (véase Smith, *et al.*, J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992), y de Vos, *et al.*, Science 255: 306-312 (1992)). Se han identificado los residuos en el anticuerpo de IL-12p40 implicados en la unión a IL-12, con base en la

estructura co-cristalina del anticuerpo de IL-12 y el antígeno de IL-12 p40. Estos se muestran en el cuadro 5 más adelante.

Los anticuerpos anti-IL-12 de la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, por lo menos una porción, secuencia o  
5 combinación seleccionada de 5 a todos los aminoácidos contiguos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Los anticuerpos de IL-12 o porciones o variantes especificadas de la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, por lo menos una porción, secuencia o combinación seleccionada de por lo menos 3  
10 a 5 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, 5-17 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2, 5-10 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 3, 5-11 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 4, 5-7 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 5, 5-9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 6; Leu21, Lys76, Met83, Ser85 de SEQ ID NO: 7.

15 Un anticuerpo anti-IL-12 puede comprender además opcionalmente un polipéptido de por lo menos uno de 70 a 100% de 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119 o 108 aminoácidos contiguos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, o porción de la misma (por ejemplo,  
20 región variable, CDR), tiene aproximadamente 70 a 100% de identidad (por ejemplo 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, 100, o cualquier escala o valor en la misma) con la secuencia de aminoácidos de la cadena correspondiente

de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Por ejemplo, puede compararse la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera con la secuencia de SEQ ID NOS: 4, 5, 6 u 8, o puede compararse la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de cadena pesada con SEQ ID NOS: 1, 2, 3 o 7. De preferencia, se determina 70 a 100% de identidad de aminoácidos (es decir, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, o cualquier escala o valor en la misma) usando un algoritmo de cómputo adecuado, como es sabido en la técnica.

El término "identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, el término "identidad" significa también el grado de homología de secuencia entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según se determina por la coincidencia entre hileras de dichas secuencias. La "identidad" y "similitud" puede calcularse fácilmente por medio de métodos conocidos que incluyen, pero no están limitados a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, parte I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D., Siam J. Applied

Math., 48: 1073 (1988). Además, pueden obtenerse valores para el porcentaje de identidad a partir de alineaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que se generan usando los valores predeterminados para el componente AlignX de Vector NT1, serie 8.0 (Informax, Frederick, MD).

5 Métodos preferidos para determinar la identidad, están diseñados para dar la coincidencia más grande entre las secuencias puestas a prueba. Métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas de cómputo públicamente disponibles. Métodos de programas de cómputo preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos  
10 secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible públicamente del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBINLM NIH Bethesda, Md. 20894:  
15 Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El algoritmo de Smith y Waterman bien conocido, puede usarse también para determinar la identidad.

Parámetros preferidos para comparación de secuencias de polipéptidos, incluyen los siguientes: (1) algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); matriz de comparación: BLOSSUM62 de  
20 Hennikoff y Hennikoff, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89: 10915-10919 (1992).

Penalización de espacio: 12

Penalización de longitud de espacio: 4

Un programa útil con estos parámetros está disponible

72

públicamente como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison Wis. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para comparaciones de secuencias peptídicas (sin penalización para espacios de extremo).

- 5                    Parámetros preferidos para la comparación de polinucleótidos, incluyen los siguientes: (1) algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970).

Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencia = 0

Penalización de espacio: 50

- 10                    Penalización de longitud de espacio: 3

Disponible como: el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison Wis. Estos son los parámetros predeterminados para comparaciones de secuencias de ácido nucleico.

- A manera de ejemplo, una secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a una secuencia de polinucleótidos, es decir, 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de referencia. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consiste de por lo menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de nucleótidos, y en donde las alteraciones pueden ocurrir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia, o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la

secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la secuencia que se va a comparar, por el por ciento numérico del por ciento de identidad respectivo (dividido entre 100), y restando ese producto del número total de  
 5 nucleótidos en SEQ ID NO: A, o  $n_{\text{sub.n}} - (x_{\text{sub.n}} \cdot y)$ ,

en donde  $n_{\text{sub.n}}$  es el número de alteraciones de nucleótidos,  $x_{\text{sub.n}}$  es el número total de nucleótidos en SEQ ID NO: A, e  $y$  es, por ejemplo, 0.70 para 70%, 0.80 para 80%, 0.85 para 85%, 0.90 para 90%, 0.95 para 95%, etc., y en donde cualquier producto no entero de  $x_{\text{sub.n}}$  e  $y$  es  
 10 redondeado hacia abajo hasta el entero más cercano antes de que se reste de  $x_{\text{sub.n}}$ .

Las alteraciones de una secuencia de polinucleótidos que codifica para el polipéptido de SEQ ID NO: 7 pueden crear mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de estructura en esta secuencia codificante, y  
 15 alterar de esta manera el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas alteraciones. Asimismo, una secuencia de polipéptidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 7, es decir, puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, de modo que  
 20 el porcentaje de identidad sea menor de 100%. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consiste de por lo menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácidos, y en donde las alteraciones pueden ocurrir en las posiciones

- amino-terminal o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia, o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, entremezcladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de
- 5 referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un determinado % de identidad se determina multiplicando el número total de aminoácidos en SEQ ID NO: 7, por el por ciento numérico del por ciento de identidad respectivo (dividido entre 100), y restando ese producto del número total de aminoácidos en SEQ ID NO: 7, o  $n_{\text{sub.a}} - (x_{\text{sub.a}} \times y)$ ,
- 10 en donde  $n_{\text{sub.a}}$  es el número de alteraciones de aminoácidos,  $x_{\text{sub.a}}$  es el número total de aminoácidos en SEQ ID NO: 7, e  $y$  es, por ejemplo, 0.70 para 70%, 0.80 para 80%, 0.85 para 85%, etc., y en donde cualquier producto no entero de  $x_{\text{sub.a}}$  e  $y$  es redondeado hacia abajo hasta el entero más cercano antes de que se reste de  $x_{\text{sub.a}}$ .
- 15 Ejemplos de secuencias de regiones variables de cadena ligera y cadena pesada se proveen en SEQ ID NOS: 1-8. Los anticuerpos de la presente invención, o variantes especificadas de los mismos, pueden comprender cualquier número de residuos de aminoácido contiguos de un anticuerpo de la presente invención, en donde ese número se selecciona del
- 20 grupo de enteros que consiste de 10 a 100% del número de residuos contiguos en un anticuerpo anti-IL-12. Opcionalmente, esta subsecuencia de aminoácidos contiguos tiene por lo menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210,

220, 230, 240, 250 o más aminoácidos de longitud, o cualquier escala o valor en la misma. Además, el número de dichas subsecuencias puede ser cualquier entero seleccionado del grupo que consiste de 1 a 20, tal como por lo menos 2, 3, 4 ó 5.

5                    Como los expertos en la técnica apreciarán, la presente invención incluye por lo menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de por lo menos 20%, 30% o 40%, y de preferencia por lo menos 50%, 60% o 70%, y más preferiblemente por lo menos 80%, 90% o 95%-100%  
10 o más (incluyendo, sin limitación, hasta 10 veces la actividad específica) de la del anticuerpo nativo (no sintético), endógeno o relacionado y conocido. Métodos para poner a prueba y cuantificar medidas de actividad enzimática y especificidad de sustrato, son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Pueden llevarse a cabo pruebas competitivas con el anticuerpo  
15 de la presente invención para determinar qué proteínas, anticuerpos y otros antagonistas compiten por la unión a IL-12p40 con el anticuerpo de la presente invención y/o comparten la región de epítipo. Estas pruebas, como es sabido fácilmente por los expertos en la técnica, evalúan la competencia entre antagonistas o ligandos por un número limitado de sitios de unión en  
20 una proteína, por ejemplo, p40. La proteína y/o el anticuerpo son inmovilizados o insolubilizados antes o después de la competencia, y la muestra unida a la subunidad p40 es separada de la muestra no unida, por ejemplo, por decantación (en donde la proteína/anticuerpo fueron

preinsolubilizados) o por centrifugación (en donde la proteína/anticuerpo fueron precipitados después de la reacción competitiva). Asimismo, la unión competitiva puede determinarse por si la función es alterada por la unión o falta de unión del anticuerpo a la proteína, por ejemplo, si la molécula de anticuerpo inhibe o potencia la actividad enzimática, por ejemplo, de un marcador. Pueden usarse ELISA y otras pruebas funcionales, como es bien sabido en la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno, como se describe en la presente, los cuales se modifican mediante la unión covalente de una porción orgánica. Dicha modificación puede producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, vida media en suero *in vivo* incrementada). La porción orgánica puede ser un grupo polimérico hidrofílico lineal o ramificado, grupo ácido graso o grupo éster de ácido graso. En modalidades particulares, el grupo polimérico hidrofílico puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 120,000 Daltons, y puede ser un polialcanglicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG)), polímero de carbohidratos, polímero de aminoácidos o polivinilpirrolidona, y el ácido graso o grupo éster de ácido graso puede comprender de alrededor de ocho a aproximadamente cuarenta átomos de carbono.

Los anticuerpos modificados y fragmentos de unión a antígeno de la invención, pueden comprender una o más porciones orgánicas que se unen

covalentemente, directamente o indirectamente, al anticuerpo. Cada porción orgánica que se une a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, puede ser independientemente un grupo polimérico hidrofílico, un grupo ácido graso o un grupo éster de ácido graso. Como se usa en la presente, el término “ácido graso” abarca ácidos monocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Un “grupo polimérico hidrofílico”, como el término se usa en la presente, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. De esta manera, un anticuerpo modificado por la unión covalente de polilisina, es abarcado por la invención. Polímeros hidrofílicos adecuados para la modificación de los anticuerpos de la invención, pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcanglicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilenglicol (mPEG), PPG, y similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrán, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos, y similares), polímeros de aminoácidos hidrofílicos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato, y similares), óxidos de polialcano (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno, y similares) y polivinilpirrolidona. De preferencia, el polímero hidrofílico que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150,000 Daltons como una entidad molecular separada. Por ejemplo, puede usarse PEG<sub>500</sub> y PEG<sub>20,000</sub>, en donde el subíndice es el peso molecular promedio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrofílico puede sustituirse con uno a aproximadamente seis grupos alquilo, ácido graso o éster de ácido graso. Pueden prepararse polímeros hidrofílicos que son

28

sustituídos con un grupo ácido graso o éster de ácido graso, usando métodos adecuados. Por ejemplo, puede acoplarse un polímero que comprenda un grupo amina a un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y puede acoplarse un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonil diimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso, a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácido graso adecuados para la modificación de anticuerpos de la invención pueden ser saturados, o pueden contener una o más unidades de insaturación. Ácidos grasos que son adecuados para la modificación de anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato ( $C_{12}$ , laurato), n-tetradecanoato ( $C_{14}$ , miristato), n-octadecanoato ( $C_{18}$ , estearato), n-eicosanoato ( $C_{20}$ , araquidato), n-docosanoato ( $C_{22}$ , behenato), n-triacontanoato ( $C_{30}$ ), n-tetracontanoato ( $C_{40}$ ), *cis*- $\Delta^9$ -octadecanoato ( $C_{18}$ , oleato), todo *cis*- $\Delta^{5,8,11,14}$ -eicosatetraenoato ( $C_{20}$ , araquidonato), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y similares. Esteres de ácido graso adecuados incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos que comprendan un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, de preferencia de uno a aproximadamente seis, átomos de carbono.

Los anticuerpos humanos modificados y fragmentos de unión a antígeno pueden prepararse usando métodos adecuados, tales como mediante reacción con uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" como

el término se usa en la presente, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrofílico, un ácido graso, un éster de ácido graso) que comprende un grupo de activación. Un "grupo de activación", es una porción química o grupo funcional que puede, bajo condiciones adecuadas, reaccionar

5 con un segundo grupo químico, formando de esta manera un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, grupos de activación reactivos a amina incluyen grupos electrófilos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS), y similares. Grupos de activación que pueden reaccionar con tioles

10 incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, tiol de ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Puede acoplarse un grupo funcional aldehído a moléculas que contengan amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fósforo trivalente para formar enlaces de fosforamidato o fosforimida. Métodos adecuados para introducir

15 grupos de activación en moléculas, se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo de activación puede ser unido directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrofílico, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de una porción de enlazador, por ejemplo, un grupo de C<sub>1</sub>-

20 C<sub>12</sub> divalente, en donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Porciones de enlazador adecuadas incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH- y -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH-

NH-. Pueden producirse agentes modificadores que comprendan una porción de enlazador, por ejemplo, haciendo reaccionar una 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 de amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede removerse del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) que expone una amina primaria que puede acoplarse a otro carboxilato según se describe, o puede hacerse reaccionar con anhídrido maleico, y el producto resultante puede ciclizarse para producir un derivado de maleimido activado del ácido graso (véase, por ejemplo, Thompson, *et al.*, WO 92/16221, cuyas enseñanzas enteras se incorporan en la presente como referencia).

Los anticuerpos modificados de la invención pueden producirse haciendo reaccionar un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno, con un agente modificador. Por ejemplo, pueden unirse porciones orgánicas al anticuerpo en una forma específica no del sitio, usando un agente modificador reactivo a amina, por ejemplo, un éster de NHS de PEG. Pueden prepararse también anticuerpos humanos modificados o fragmentos de unión a antígeno, produciendo enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intracadena) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. El anticuerpo reducido o fragmento de unión a antígeno puede hacerse reaccionar entonces con un agente modificador reactivo a tiol, para producir el anticuerpo modificado de la invención. Anticuerpos humanos modificados y fragmentos de unión a

antígeno que comprenden una porción orgánica que se une a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención, pueden prepararse usando métodos adecuados, tales como proteólisis inversa (véase 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); y 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).

#### 10                    Anticuerpos anti-idiotípicos para composiciones de anticuerpo anti-IL-12

Además de anticuerpos anti-IL-12 monoclonales, la presente invención está dirigida también a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para dichos anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id, es  
 15 un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados en general con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuente del anticuerpo Id, con el anticuerpo o una región que contenga CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y  
 20 responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante, y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id puede usarse también como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

82

La presente invención provee también por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 que comprende por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis o más anticuerpos anti-IL-12 de la misma, como se describe en la presente y/o como es sabido en la técnica, que se proveen en una composición, mezcla o forma de ocurrencia no natural. Dichas composiciones comprenden composiciones de ocurrencia no natural que comprenden por lo menos una o dos variantes de longitud completa, C- y/o N-eliminadas terminalmente, dominios, fragmentos o variantes especificados, de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-12 seleccionadas del grupo que consiste de 70 a 100% de los aminoácidos contiguos de SEQ ID NOS: 7 u 8, o fragmentos, dominios o variantes especificados de las mismas. Composiciones de anticuerpo anti-IL-12 preferidas, incluyen por lo menos uno o dos fragmentos, dominios o variantes de longitud completa, como por lo menos una CDR o LBP que contenga porciones de la secuencia del anticuerpo anti-IL-12 descritas en la presente, por ejemplo, 70-100% de SEQ ID NOS: 1-6, 7 u 8, o fragmentos, dominios o variantes especificados de las mismas. Otras composiciones preferidas comprenden, por ejemplo, de 40 a 99% de por lo menos una de 70-100% de SEQ ID NOS: 1-6, 7 u 8, etc., o fragmentos, dominios o variantes especificados de las mismas. Dichos porcentajes de la composición son en peso, volumen, concentración, molaridad o molalidad como soluciones líquidas o secas, mezclas, suspensiones, emulsiones, partículas, polvo o coloides, como es sabido en la

técnica o como se describe en la presente.

Composiciones de anticuerpo que comprenden otros  
ingredientes terapéuticamente activos

- 5 Las composiciones de anticuerpo de la invención pueden comprender además opcionalmente una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo menos uno de un fármaco antiinfeccioso, un fármaco para el sistema cardiovascular (CV), un fármaco para el sistema nervioso central (SNC), un fármaco para el sistema nervioso
- 10 autónomo (SNA), un fármaco para el tracto respiratorio, un fármaco para el tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el balance de fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un fármaco antineoplásico, un fármaco de inmunomodulación, un fármaco oftálmico,ótico o nasal, un fármaco tópico, un fármaco nutricional, o similares. Dichos fármacos son bien
- 15 conocidos en la técnica, e incluyen formulaciones, indicaciones, dosificación y administración para cada uno presentado en la presente (véase, por ejemplo, Nursing 2001 Handbook of Drugs, vigésima primera edición, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; y
- 20 Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, cada una incorporada enteramente en la presente como referencia).

El fármaco antiinfeccioso puede ser por lo menos uno seleccionado de amebicidas o por lo menos uno de antiprotozoarios,

antihelmínticos, antimicóticos, antipalúdicos, antituberculosos, o por lo menos uno de antileprosos, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas, antivirales, antiinfecciosos macrólidos y antiinfecciosos diversos. El fármaco CV puede ser por lo menos

5 uno seleccionado de inotrópicos, antiarrítmicos, antianginosos, antihipertensivos, antilipidémicos y fármacos cardiovasculares diversos. El fármaco para el SNC puede ser por lo menos uno seleccionado de analgésicos no narcóticos, o por lo menos uno seleccionado de antipiréticos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, narcótico o por lo menos un

10 analgésico opioide, sedante-hipnótico, anticonvulsivantes, antidepresivos, fármacos antiansiedad, antipsicóticos, estimulantes del sistema nervioso central, antiparkinsonianos y fármacos diversos para el sistema nervioso central. El fármaco para el SNA puede ser por lo menos uno seleccionado de colinérgicos (parasimpaticomiméticos), anticolinérgicos, adrenérgicos

15 (simpaticomiméticos), bloqueadores adrenérgicos (simpaticolíticos), relajantes del músculo esquelético, y bloqueadores neuromusculares. El fármaco para el tracto respiratorio puede ser por lo menos uno seleccionado de antihistamínicos, broncodilatadores, expectorantes o por lo menos uno de antitusivos o fármacos respiratorios diversos. El fármaco para el tracto GI

20 puede ser por lo menos uno seleccionado de antiácidos o por lo menos uno de adsorbentes o por lo menos uno de antiflatulentos, enzimas digestivas o por lo menos uno de solubilizadores de cálculos biliares, antidiarreicos, laxantes, antieméticos y fármacos antiulcerosos. El fármaco hormonal puede

85

ser por lo menos uno seleccionado de corticosteroides, andrógenos o por lo menos uno de esteroides anabólicos, estrógenos o por lo menos uno de progestinas, gonadotropinas, fármacos antidiabéticos o por lo menos uno de glucagon, hormonas de tiroides, antagonistas de hormonas de tiroides, 5 hormonas de pituitaria y fármacos tipo paratiroideos. El fármaco para el balance de fluidos y electrolitos puede ser por lo menos uno seleccionado de diuréticos, electrolitos o por lo menos uno de soluciones de reemplazo, acidificadores o por lo menos uno de alcalinizadores. El fármaco hematológico puede ser por lo menos uno seleccionado de hematínicos, anticoagulantes, 10 derivados de sangre y enzimas trombolíticas. Los antineoplásicos pueden ser por lo menos uno seleccionado de fármacos alquilantes, antimetabolitos, antineoplásicos antibióticos, antineoplásicos que alteran el balance hormonal, y antineoplásicos diversos. El fármaco de inmunomodulación puede ser por lo menos uno seleccionado de inmunosupresores, vacunas o por lo menos uno 15 de toxoides, antitoxinas o por lo menos uno de antivenenos, sueros inmunes y modificadores de respuesta biológica. Los fármacos oftálmicos, óticos y nasales pueden ser por lo menos uno seleccionado de antiinfecciosos oftálmicos, antiinflamatorios oftálmicos, mióticos, midriáticos, vasoconstrictores oftálmicos, oftálmicos diversos, óticos y fármacos nasales. 20 El fármaco tópico puede ser por lo menos uno seleccionado de antiinfecciosos locales, escabicidas o por lo menos uno de pediculicidas y corticosteroides tópicos. El fármaco nutricional puede ser por lo menos uno seleccionado de vitaminas, minerales o calóricos. Véase, por ejemplo, el contenido de *Nursing*

*2001 Drug Handbook*, citado anteriormente.

El amebicida o antiprotozoarios (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de atovacuona, clorhidrato de cloroquina, fosfato de cloroquina, metronidazol, clorhidrato de metronidazol e isetionato

5 de pentamidina. El antihelmíntico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de mebendazol, pamoato de pirantel y tiabendazol. El antimicótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de anfotericina B, complejo de anfotericina B y sulfato de colesteroil, complejo de anfotericina B y lípido, anfotericina B liposomal, fluconazol, flucitosina,

10 griseofulvina de tamaño micrométrico, griseofulvina de tamaño ultramicrométrico, itraconazol, ketoconazol, nistatina y clorhidrato de terbinafina. El antipalúdico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de cloroquina, fosfato de cloroquina, doxiciclina, sulfato de hidroxicloroquina, clorhidrato de mefloquina, fosfato de primaquina,

15 pirimetamina y pirimetamina con sulfadoxina. El antituberculoso o antileproso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clofazimina, cicloserina, dapsona, clorhidrato de etambutol, isoniazid, pirazinamida, rifabutina, rifampina, rifapentina y sulfato de estreptomina. El aminoglucósido (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de

20 amikacina, sulfato de gentamicina, sulfato de neomicina, sulfato de estreptomina y sulfato de tobramicina. La penicilina (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de amoxicilina/clavulanato potásico, amoxicilina trihidratada, ampicilina, ampicilina sódica, ampicilina trihidratada,

ampicilina sódica/sulbactam sódico, cloxacilina sódica, dicloxacilina sódica, mezlocilina sódica, nafcilina sódica, oxacilina sódica, penicilina G benzatina, penicilina P potásica, penicilina G procaínica, penicilina G sódica, penicilina V potásica, piperacilina sódica, piperacilina sódica/tazobactam sódico, ticarcilina

5 disódica y ticarcilina disódica/clavulanato potásico. La cefalosporina (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de por lo menos uno de cefaclor, cefadroxil, cefazolina sódica, cefdinir, clorhidrato de cefepima, cefixima, cefmetazol sódico, cefonicid sódico, cefoperazona sódica, cefotaxima sódica, cefotetan disódico, cefoxitina sódica, cefpodoxima proxetil,

10 cefprozil, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima sódica, ceftriaxona sódica, cefuroxima axetil, cefuroxima sódica, clorhidrato de cefalexina, cefalexina monohidratada, cefradina y loracarbef. La tetraciclina (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de clorhidrato de demeclociclina, doxiciclina cálcica, hclato de doxiciclina, clorhidrato de doxiciclina, doxiciclina

15 monohidratada, clorhidrato de minociclina y clorhidrato de tetraciclina. La sulfonamida (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de co-trimoxazol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y sulfisoxazol acetilo. La fluoroquinolona (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de mesilato de alatrofloxacin, ciprofloxacina, enoxacina,

20 levofloxacina, clorhidrato de lomefloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina y mesilato de trovafloxacina. El antiviral (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de abacavir, aciclovir sódico, clorhidrato de amantadina, amprenavir, cidofovir, mesilato de

delavirdina, didanosina, efavirenz, famciclovir, fomivirsén sódico, foscarnet sódico, ganciclovir, sulfato de indinavir, lamivudina, lamivudina/zidovudina, mesilato de nelfinavir, nevirapina, fosfato de oseltamivir, ribavirina, clorhidrato de rimantadina, ritonavir, saquinavir, mesilato de saquinavir, estavudina, 5 clorhidrato de valaciclovir, zalcitabina, zanamivir y zidovudina. El antiinfeccioso macrólido (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina base, estolato de eritromicina, etilsulccinato de eritromicina, lactobionato de eritromicina y estearato de eritromicina. El antiinfeccioso diverso (por lo menos 10 uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de aztreonam, bacitracina, succinato sódico de cloranfenicol, clorhidrato de clindamicina, clorhidrato de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, imipenem y cilastatina sódica, meropenem, macrocristales de nitrofurantoína, microcristales de nitrofurantoína, quinupristina/dalfopristina, clorhidrato de espectinomicina, 15 trimetoprima y clorhidrato de vancomicina (véase, por ejemplo, las pp. 24-214 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El inotrópico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de lactato de amrinona, digoxina y lactato de milrinona. El antiarrítmico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de 20 adenosina, clorhidrato de amiodarona, sulfato de atropina, tosilato de bretilio, clorhidrato de diltiazem, disopiramida, fosfato de disopiramida, clorhidrato de esmolol, acetato de flecainida, fumarato de ibutilida, clorhidrato de lidocaína, clorhidrato de mexiletina, clorhidrato de moricizina, fenitoína, fenitoína sódica,

clorhidrato de procainamida, clorhidrato de propafenona, clorhidrato de propranolol, bisulfato de quinidina, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina, sotalol, clorhidrato de tocainida y clorhidrato de verapamilo. El antianginoso (por lo menos uno) puede ser por lo menos

5 uno seleccionado de besilato de amlodipina, nitrito de amilo, clorhidrato de bepridil, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbide, mononitrato de isosorbide, nadolol, clorhidrato de nicardipina, nifedipina, nitroglicerina, clorhidrato de propranolol, verapamilo y clorhidrato de verapamilo. El

10 antihipertensivo (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de acebutolol, besilato de amlodipina, atenolol, clorhidrato de benazepril, clorhidrato de betaxolol, fumarato de bisoprolol, candersatán cilexetil, captopril, clorhidrato de carteolol, carvedilol, clonidina, clorhidrato de clonidina, diazoxida, clorhidrato de diltiazem, mesilato de doxazosina, enalaprilat, maleato de enalapril, mesilato de eprosartán, felodipina, mesilato

15 de fenoldopam, fosinopril sódico, acetato de guanabenz, sulfato de guanadrel, clorhidrato de guanfacina, clorhidrato de hidralazina, irbesartán isradipina, clorhidrato de labetalol, lisinopril, losartán potásico, metildopa, clorhidrato de metildopa, succinato de metoprolol, tartrato de metoprolol, minoxidil, clorhidrato de moexipril, nadolol, clorhidrato de nicardipina, nifedipina,

20 nisoldipina, nitroprusiato sódico, sulfato de penbutolol, perindropil erbumina, mesilato de fentolamina, pindolol, clorhidrato de prazosina, clorhidrato de propranolol, clorhidrato de quinapril, ramipril, telmisartán, clorhidrato de terazosina, maleato de timolol, trandolapril, valsartán y clorhidrato de

- verapamilo. El antilipídémico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de atorvastatina cálcica, cerivastatina sódica, colestiramina, clorhidrato de colestipol, fenofibrato (micronizado), fluvastatina sódica, gemfibrozilo, lovastatina, niacina, pravastatina sódica y simvastatina. El
- 5 fármaco CV diverso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de abciximab, alprostadil, clorhidrato de arbutamina, cilostazol, bisulfato de clopidogrel, dipiridamol, eptifibatida, clorhidrato de midrodrina, pentoxifilina, clorhidrato de ticlopidina y clorhidrato de tirofibán (véase, por ejemplo, las pp. 215-336 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).
- 10 El analgésico no narcótico o antipirético (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de acetaminofén, aspirina, trisalisilato magnésico de colina, diflunisal y salicilato de magnesio. El fármaco antiinflamatorio no esterooidal (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno
- 15 seleccionado de celecoxib, diclofenaco potásico, diclofenaco sódico, etodolaco, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, indometacina sódica trihidratada, ketoprofeno, ketorolaco trometamina, nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib y sulindac. El analgésico opioide o narcótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de alfentanilo, clorhidrato de
- 20 buprenorfina, tartrato de butorfanol, fosfato de codeína, sulfato de codeína, citrato de fentanilo, sistema transdérmico de fentanilo, fentanilo transmucoso, clorhidrato de hidromorfona, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de metadona, clorhidrato de morfina, sulfato de morfina, tartrato de morfina,

clorhidrato de nalbufina, clorhidrato de oxicodona, pectinato de oxicodona, clorhidrato de oximorfona, clorhidrato de pentazocina, clorhidrato de pentazocina y clorhidrato de naloxona, lactato de pentazocina, clorhidrato de propoxifeno, napsilato de propoxifeno, clorhidrato de remifentanilo, citrato de sufentanilo y clorhidrato de tramadol. El sedante-hipnótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de hidrato de cloral, estazolam, clorhidrato de flurazepam, pentobarbital, pentobarbital sódico, fenobarbital sódico, secobarbital sódico, temazepam, triazolam, zaleplon y tartrato de zolpidem. El anticonvulsivante (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de acetazolamida sódica, carbamazepina, clonazepam, clorazepato dipotásico, diazepam, divalproex sódico, etosuximida, fosfenitoína sódica, gabapentina, lamotrigina, sulfato de magnesio, fenobarbital, fenobarbital sódico, fenitoína, fenitoína sódica, fenitoína sódica (extendida), primidona, clorhidrato de tiagabina, topiramato, valproato sódico y ácido valproico. El antidepresivo (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de amitriptilina, pamoato de amitriptilina, amoxapina, clorhidrato de bupropión, bromhidrato de citalopram, clorhidrato clomipramina, clorhidrato de desipramina, clorhidrato de doxepina, clorhidrato de fluoxetina, clorhidrato de imipramina, pamoato de imipramina, mirtazapina, clorhidrato de nefazodona, clorhidrato de nortriptilina, clorhidrato de paroxetina, sulfato de fenelzina, clorhidrato de sertralina, sulfato de tranilcipromina, maleato de trimipramina y clorhidrato de venlafaxina. El fármaco antiansiedad (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno

- seleccionado de alprazolam, clorhidrato de buspirona, clorodiazepóxido, clorhidrato de clorodiazepóxido, clorazepato dipotásico, diazepam, clorhidrato de doxepina, embonato de hidroxizina, clorhidrato de hidroxizina, pamoato de hidroxizina, lorazepam, meprobamato, clorhidrato de midazolam y oxazepam.
- 5 El fármaco antipsicótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de cloropromazina, clozapina, decanoato de flufenazina, enantato de flufenazina, clorhidrato de flufenazina, haloperidol, decanoato de haloperidol, lactato de haloperidol, clorhidrato de loxapina, succinato de loxapina, besilato de mesoridazina, clorhidrato de molindona,
- 10 olanzapina, perfenazina, pimozida, proclorperazina, fumarato de quetiapina, risperidona, clorhidrato de tioridazina, tiotixeno, clorhidrato de tiotixeno y clorhidrato de trifluoperazina. El estimulante del sistema nervioso central (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de anfetamina, cafeína, sulfato de dextroanfetamina, clorhidrato de doxapram,
- 15 clorhidrato de metanfetamina, clorhidrato de metilfenidato, modafinil, pemolina y clorhidrato de fentermina. El antiparkinsoniano (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de amantadina, mesilato de benztropina, clorhidrato de biperideno, lactato de biperideno, mesilato de bromocriptina, carbidopalevodopa, entacapona, levopona, mesilato de
- 20 pergolida, diclorhidrato de pramipexol, clorhidrato de ropinirol, clorhidrato de selegilina, tolcapona y clorhidrato de trihexifenidilo. El fármaco diverso para el sistema nervioso central (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de riluzol, clorhidrato de bupropión, clorhidrato de donepecilo,

droperidol, maleato de fluvoxamina, carbonato de litio, citrato de litio, clorhidrato de naratriptán, nicotina polacrilex, sistema transdérmico de nicotina, propofol, benzoato de rizatriptán, clorhidrato de sibutramina monohidratada, succinato de sumatriptán, clorhidrato de tacrina y zolmitriptán  
 5 (véase, por ejemplo, las pp. 337-530 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El colinérgico (por ejemplo, parasimpaticomimético) (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de cloruro de betanecol, cloruro de edrofonio, bromuro de neostigmina, metilsulfato de neostigmina, salicilato de fisostigmina y bromuro de piridostigmina. El  
 10 anticolinérgico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de atropina, clorhidrato de diciclomina, glicopirrolato, hiosciamina, sulfato de hiosciamina, bromuro de propantelina, escopolamina, butilbromuro de escopolamina y bromhidrato de escopolamina. El adrenérgico (simpaticomimético) (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno  
 15 seleccionado de clorhidrato de dobutamina, clorhidrato de dopamina, bitartrato de metaraminol, bitartrato de norepinefrina, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de pseudoefedrina y sulfato de pseudoefedrina. El bloqueador adrenérgico (simpaticolítico) (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno  
 20 seleccionado de mesilato de dihidroergotamina, tartrato de ergotamina, maleato de metilsergida y clorhidrato de propranolol. El relajante del músculo esquelético (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de baclofeno, carisoprodol, clorofoxazona, clorhidrato de ciclobenzaprina, dantroleno sódico, metocarbamol y clorhidrato de tizamidina. El bloqueador

neuromuscular (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de besilato de atracurio, besilato de cisatracurio, cloruro de doxacurio, cloruro de mivacurio, bromuro de pancuronio, bromuro de pipecuronio, bromuro de rapacuronio, bromuro de rocuronio, cloruro de succinilcolina, cloruro de tubocurarina y bromuro de vecuronio (véase, por ejemplo, las pp. 531-84 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El antihistamínico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de maleato de bromfeniramina, clorhidrato de cetirizina, maleato de clorfeniramina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, clorhidrato de difenhidramina, clorhidrato de fexofenadina, loratadina, clorhidrato de prometazina, teoclato de prometazina y clorhidrato de triprolidina. El broncodilatador (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de albuterol, sulfato de albuterol, aminofilina, sulfato de atropina, sulfato de efedrina, epinefrina, bitartrato de epinefrina, clorhidrato de epinefrina, bromuro de ipratropio, isoproterenol, clorhidrato de isoproterenol, sulfato de isoproterenol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de metaproterenol, oxtrifilina, acetato de pirbuterol, xinafoato de salmeterol, sulfato de terbutalina y teofilina. El expectorante o antitusivo (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de benzonatato, fosfato de codeína, sulfato de codeína, bromhidrato de dextrometorfán, clorhidrato de difenhidramina, guaifenesina y clorhidrato de hidromorfona. El fármaco respiratorio diverso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de acetilcisteína, dipropionato de beclometasona, beractant, budesonida,

95

calfactant, cromolín sódico, dornase alfa, epoprostenol sódico, flunisolida, propionato de fluticasona, montelukast sódico, nedocromil sódico, palvizumab, acetónido de triamcinolona, zafirlukast y zileutón (véase, por ejemplo, las pp. 585-642 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

- 5 El antiácido, adsorbente o antiflatulento (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de carbonato de aluminio, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, magaldrato, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, simeticona y bicarbonato de sodio. La enzima digestiva o solubilizador de cálculos biliares (por lo menos uno) puede ser por lo menos
- 10 uno seleccionado de pancreatina, pancrelipasa y ursodiol. El antidiarreico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de atapulgita, subsalicilato de bismuto, polycarbófilo cálcico, clorhidrato de difenoxilato o sulfato de atropina, loperamida, acetato de octreótido, tintura de opio y tintura de opio (alcanforada). El laxante (por lo menos uno) puede ser por lo menos
- 15 uno seleccionado de bisocodilo, polycarbófilo cálcico, cáscara sagrada, extracto fluido aromático de cáscara sagrada, extracto fluido de cáscara sagrada, aceite de ricino, docusato cálcico, docusato sódico, glicerina, lactulosa, citrato de magnesio, hidróxido de magnesio, sulfato de magnesio, metilcelulosa, aceite mineral, polietilenglicol o solución de electrolitos,
- 20 *Psyllium*, sen y fosfatos de sodio. El antiemético (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de clorpromazina, dimenhidrinato, mesilato de dolasetrón, dronabinol, clorhidrato de granisetron, clorhidrato de meclizina, clorhidrato de metoclopramida, clorhidrato de

ondansetrón, perfenazina, proclorperazina, edisilato de proclorperazina, maleato de proclorperazina, clorhidrato de prometazina, escopolamina, maleato de trietilperazina y clorhidrato de trimetobenzamida. El fármaco antiulceroso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de

5 cimetidina, clorhidrato de cimetidina, famotidina, lansoprazol, misoprostol, nizatidina, omeprazol, rabeprozol sódico, citrato de bismuto, ranitidina, clorhidrato de ranitidina y sucralfato (véase, por ejemplo, las pp. 643-95 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El corticosteroide (por lo menos uno) puede ser por lo menos

10 uno seleccionado de betametasona, acetato de betametasona o fosfato sódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, acetato de fludrocortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de

15 hidrocortisona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, prednisona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y diacetato de triamcinolona. El andrógeno o esteroide anabólico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno

20 seleccionado de danazol, fluoximesterona, metiltestosterona, decanoato de nandrolona, fenpropionato de nandrolona, testosterona, cipionato de testosterona, enantato de testosterona, propionato de testosterona y sistema transdérmico de testosterona. El estrógeno o progestina (por lo menos uno)

puede ser por lo menos uno seleccionado de estrógenos esterificados, estradiol, cipionato de estradiol, sistema transdérmico de acetato de noretindrona/estradiol, valerato de estradiol, estrógenos (conjugados), estropipato, etinil estradiol, etinil estradiol y desogestrel, etinil estradiol y

5 diacetato de etinodiol, etinil estradiol y desogestrel, etinil estradiol y diacetato de etinodiol, etinil estradiol y levonorgestrel, etinil estradiol y noretindrona, etinil estradiol y acetato de noretindrona, etinil estradiol y norgestimato, etinil estradiol y norgestrel, etinil estradiol y noretindrona y acetato y fumarato

10 noretindrona, noretindrona, acetato de noretindrona, norgestrel y progesterona. La gonadotropina (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de acetato de ganirelix, acetato de gonadorelina, acetato de histrelina y menotropinas. El antidiabético o glucagon (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de acarbosa, cloropropamida,

15 glimepirida, glipizida, glucagon, gliburida, insulinas, clorhidrato de metformina, miglitol, clorhidrato de pioglitazona, repaglinida, maleato de rosiglitazona y troglitazona. La hormona tiroidea (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de levotiroxina sódica, liotironina sódica, liotrix y tiroides. El antagonista de hormona de tiroides (por lo menos uno) puede ser por lo

20 menos uno seleccionado de metimazol, yoduro de potasio, yoduro de potasio (solución saturada), propiltiouracilo, yodo radiactivo (yoduro sódico,  $^{131}\text{I}$ ) y solución fuerte de yodo. La hormona de pituitaria (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de corticotropina, cosintropina, acetato de

desmopresina, acetato de leuprolida, corticotropina repositaria, somatrem, somatotropina y vasopresina. El fármaco tipo paratiroides (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de calcifediol, calcitonina (humana), calcitonina (salmón), calcitriol, dihidrotaquisterol y etidronato disódico (véase, 5 por ejemplo, las pp. 696-796 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El diurético (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de acetazolamida, acetazolamida sódica, clorhidrato de amilorida, bumetanida, clortalidona, etacrinato sódico, ácido etacrínico, furosemida, hidroclorotiazida, indapamida, manitol, metolazona, 10 espironolactona, torsemida, triamtereno y urea. La solución de reemplazo o de electrolitos (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de acetato de calcio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), fosfato de calcio (tribásico), dextrán (de alto 15 peso molecular), dextrán (de bajo peso molecular), almidón heterogéneo, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, inyección de Ringer, inyección de Ringer (lactada) y cloruro de sodio. El acidificador o alcalinizador (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de bicarbonato 20 de sodio, lactato de sodio y trometamina (véase, por ejemplo, las pp. 797-833 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El hematínico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de fumarato ferroso, gluconato ferroso, sulfato ferroso, sulfato

ferroso (deshidratado), dextrán de hierro, sorbitol de hierro, complejo de polisacárido y hierro y complejo de gluconato férrico de sodio. El anticoagulante (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de ardeparina sódica, dalteparina sódica, danaparoid sódico, enoxaparina sódica, heparina cálcica, heparina sódica y warfarina sódica. El derivado de sangre (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de albúmina a 5%, albúmina a 25%, factor anhemofílico, complejo de coagulante y anti-inhibidor, antitrombina III (humana), factor IX (humano), complejo de factor IX, y fracciones de proteína plasmática. La enzima trombolítica (por lo menos una) puede ser por lo menos una seleccionada de alteplasa, anistreplasa, reteplasa (recombinante), estreptocinasa y urocinasa (véase, por ejemplo, las pp. 834-66 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El fármaco alquilante (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, lomustina, clorhidrato de mecloretamina, melfalán, clorhidrato de melfalán, estreptozocina, temozolomida y tiotepa. El antimetabolito (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de capecitabina, cladribina, citarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, hidroxiurea, mercaptopurina, metotrexato, metotrexato sódico y tioguanina. El antineoplásico antibiótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de bleomicina, dactinomicina, citrato de daunorrubicina liposomal, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorrubicina, clorhidrato de doxorrubicina liposomal, clorhidrato de

- epirubicina, clorhidrato de idarubicina, mitomicina, pentostatina, plicamicina y valrubicina. El antineoplásico (por lo menos uno) que altera el balance hormonal, puede ser por lo menos uno seleccionado de anastrozol, bicalutamida, fosfato sódico de estramustina, exemestano, flutamida, acetato de goserelina, letrozol, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, nilutamida, citrato de tamoxifeno, testolactona y citrato de toremifeno. El antineoplásico diverso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de asparaginasa, bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (intravesical vivo), dacarbazina, docetaxel, etopósido, fosfato de etopósido, clorhidrato de gemcitabina, clorhidrato de irinotecán, mitotano, clorhidrato de mitoxantrona, paclitaxel, pegaspargasa, porfímero sódico, clorhidrato de procarbazona, rituximab, tenipósido, clorhidrato de topotecan, trastuzumab, tretinoína, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina (véase, por ejemplo, las pp. 867-963 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).
- El inmunosupresor (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de azatioprina, basiliximab, ciclosporina, daclizumab, globulina inmune linfocítica, muromonab-CD3, micofenolato mofetil, clorhidrato de micofenolato mofetil, sirolimus y tacrolimus. La vacuna o toxoide (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de vacuna BCG, vacuna anticólera, toxoides diftérico y tetánico (adsorbidos), toxoides diftérico y tetánico y vacuna antipertussis acelular adsorbida, toxoides diftérico y tetánico y vacuna antipertussis de células enteras, vacunas de conjugado b de *Haemophilus*, vacuna contra la hepatitis A (inactivada), vacuna contra la

hepatitis B (recombinante), vacuna antiinfluenza 1999-2000, tipos trivalentes A y B (antígeno de superficie purificado), vacuna antiinfluenza 1999-2000, tipos trivalentes A y B (subvirión o subvirión purificado), vacuna antiinfluenza 1999-2000, tipos trivalentes A y B (virión entero), vacuna del virus de la encefalitis japonesa (inactivada), vacuna de la enfermedad de Lyme (OspA recombinante), vacuna contra el sarampión, parotiditis y rubéola (viva), vacuna contra el sarampión, parotiditis y rubéola (atenuada viva), vacuna antisarampionosa (atenuada viva), vacuna de polisacáridos antimeningocócica, vacuna antiparotídica (viva), vacuna antipeste, vacuna antineumocócica (polivalente), vacuna de poliovirus (inactivada), vacuna de poliovirus (viva, oral, trivalente), vacuna antirrábica (adsorbida), vacuna antirrábica (células diploides humanas), vacuna contra la rubéola y la parotiditis (viva), vacuna antirrubéolica (viva, atenuada), toxoide antitetánico (adsorbido), toxoide antitetánico (fluido), vacuna antitifoidea (oral), vacuna antitifoidea (parenteral), vacuna de polisacáridos Vi antitifoidea, vacuna anti-varicela y vacuna anti-fiebre amarilla. La antitoxina o el antiveneno (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de antiveneno de la viuda negra, antiveneno de los crotálidos (polivalente), antitoxina diftérica (equina) y antiveneno de *Micrurus fulvius*. El suero inmune (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de globulina inmune de citomegalovirus (intravenosa), globulina inmune de hepatitis B (humana), globulina inmune intramuscular, globulina inmune intravenosa, globulina inmune de la rabia (humana), globulina inmune intravenosa del virus sincicial

- respiratorio (humana), globulina inmune de Rh<sub>0</sub>(D) (humana), globulina inmune de Rh<sub>0</sub>(D) intravenosa (humana), globulina inmune del tétanos (humana) y globulina inmune anti-varicela-zoster. El modificador de respuesta biológica (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de
- 5 aldesleucina, eritropoyetina alfa, filgrastim, acetato de glatiramer para inyección, interferón alfacon-1, interferón alfa-2a (recombinante), interferón alfa-2b (recombinante), interferón beta-1a, interferón beta-1b (recombinante), interferón gamma-1b, clorhidrato de levamisol, oprelvekina y sargramostim (véase, por ejemplo, las pp. 964-1040 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).
- 10 El antiinfeccioso oftálmico (por lo menos uno) puede seleccionarse de bacitracina, cloranfenicol, clorhidrato de ciprofloxacina, eritromicina, sulfato de gentamicina, ofloxacina a 0.3%, sulfato de polimixina B, sulfacetamida sódica a 10%, sulfacetamida sódica a 15%, sulfacetamida sódica a 30%, tobramicina y vidarabina. El antiinflamatorio oftálmico (por lo
- 15 menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, diclofenaco sódico a 0.1%, fluorometolona, flurbiprofeno sódico, ketorolaco trometamina, acetato de prednisolona (suspensión) y fosfato sódico de prednisolona (solución). El miótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de cloruro de
- 20 acetilcolina, carbacol (intraocular), carbacol (tópico), yoduro de ecotiofato, pilocarpina, clorhidrato de pilocarpina y nitrato de pilocarpina. El midriático (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de sulfato de atropina, clorhidrato de ciclopentolato, clorhidrato de epinefrina, borato de

epinefrilo, bromhidrato de homatropina, clorhidrato de fenilefrina, bromhidrato de escopolamina y tropicamida. El vasoconstrictor oftálmico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina y clorhidrato de tetrahidrozolina. El oftálmico

5 diverso (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de clorhidrato de apraclonidina, clorhidrato de betaxolol, tartrato de brimonidina, clorhidrato de carteolol, clorhidrato de dipivefrina, clorhidrato de dorzolamida, difumarato de emedastina, fluoresceína sódica, fumarato de ketotifeno, latanoprost, clorhidrato de levobunolol, clorhidrato de metipranolol, cloruro de

10 sodio (hipertónico) y maleato de timolol. Elótico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de ácido bórico, peróxido de carbamida, cloranfenicol y condensado de oleato polipeptídico de trietanolamina. El fármaco nasal (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de dipropionato de beclometasona, budesonida, sulfato de efedrina,

15 clorhidrato de epinefrina, flunisolida, propionato de fluticasona, clorhidrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de tetrahidrozolina, acetónido de triamcinolona y clorhidrato de xilometazolina (véase, por ejemplo, las pp. 1041-97 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

El antiinfeccioso local (por lo menos uno) puede ser por lo menos

20 uno seleccionado de aciclovir, anfotericina B, ácido azelaico en crema, bacitracina, nitrato de butoconazol, fosfato de clindamicina, clotrimazol, nitrato de econazol, eritromicina, sulfato de gentamicina, ketoconazol, acetato de mafenida, metronidazol (tópico), nitrato de miconazol, mupirocina, clorhidrato

de naftifina, sulfato de neomicina, nitrofurazona, nistatina, sulfadiazina de plata, clorhidrato de terbinafina, terconazol, clorhidrato de tetraciclina, tioconazol y tolnaftato. El escabicida o pediculicida (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de crotamitón, lindano, permetrina y

5 piretrinas. El corticosteroide tópico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, propionato de clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, diacetato de diflorasona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, flurandrenolida, propionato de

10 fluticasona, halcionida, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, furoato de mometasona y acetónido de triamcinolona (véase, por ejemplo, las pp. 1098-1136 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

La vitamina o el mineral (por lo menos uno) puede ser por lo

15 menos uno seleccionado de vitamina A, complejo de vitamina B, cianocobalamina, ácido fólico, hidroxocobalamina, leucovorina cálcica, niacina, niacinamida, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina C, vitamina D, colecalciferol, ergocalciferol, análogo de vitamina D, doxercalciferol, paricalcitol, vitamina E, análogo de vitamina K,

20 fitonadiona, fluoruro de sodio, fluoruro de sodio (tópico), elementos traza, cromo, cobre, yodo, manganeso, selenio y zinc. El calórico (por lo menos uno) puede ser por lo menos uno seleccionado de infusiones de aminoácidos (cristalinas), infusiones de aminoácidos en dextrosa, infusiones de

aminoácidos con electrolitos, infusiones de aminoácidos con electrolitos en dextrosa, infusiones de aminoácidos para disfunción hepática, infusiones de aminoácidos para alto estrés metabólico, infusiones de aminoácidos para disfunción renal, dextrosa, emulsiones de grasa y triglicéridos de cadena media (véase, por ejemplo, las pp. 1137-63 de *Nursing 2001 Drug Handbook*).

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención pueden comprender además por lo menos uno de cualquier cantidad adecuada y efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprenda por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia, opcionalmente comprendiendo además por lo menos uno seleccionado de por lo menos un antagonista de FNT (por ejemplo, pero no limitado a, un antagonista de proteína o químico de FNT, anticuerpo monoclonal o policlonal de FNT o fragmento del mismo, un receptor de FNT soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión del mismo, o un antagonista de FNT de molécula pequeña, por ejemplo, proteína de unión a FNT I o II (TBP-1 o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, entercept, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, y similares), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etarnercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo,

aminoglucósido, un antimicótico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes,

5 un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, eritropoyetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un

10 inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un modulador del receptor de estrógeno, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un

15 hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepecilo, tacrina, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo de la misma, dornase alfa (Pulmozyme), una citocina o un antagonista de citocina. Ejemplos no limitativos de dichas citocinas incluyen, pero no están

20 limitados a, cualquiera de IL-1 a IL-23 (por ejemplo, IL-1, IL-2, etc.). Dosificaciones adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, segunda edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon

Pocket Pharmacopoeia 2000, edición de lujo, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), cuyas referencias se incorporan enteramente en la presente como referencia.

Dichos anticancerosos o antinfeciosos pueden incluir también

5 moléculas de toxina que se asocian, unen, co-formulan o co-administran con por lo menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede actuar opcionalmente para destruir selectivamente la célula o tejido patológico. La célula patológica puede ser una célula cancerosa o de otro tipo. Dichas toxinas pueden ser, pero no están limitadas a, toxina purificada o

10 recombinante, o fragmento de toxina que comprenda por lo menos un dominio citotóxico funcional de toxina, por ejemplo, seleccionada de por lo menos una de ricina, toxina diftérica, una toxina venenosa o una toxina bacteriana. El término toxina incluye también endotoxinas y exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus de ocurrencia natural, mutante o recombinante, que

15 pueda causar alguna condición patológica en humanos y otros mamíferos, incluyendo choque tóxico, que puede resultar en muerte. Dichas toxinas pueden incluir, pero no están limitadas a, enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* enterotoxigénica, enterotoxina termoestable (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, toxina de síndrome de choque tóxico-1 (TSST-

20 1), enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB) o C (SEC), enterotoxinas estreptocócicas, y similares. Dichas bacterias incluyen, pero no están limitadas a, cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (por ejemplo, cepas del serotipo 0157:H7), especies de

108

*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 cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*),

5 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*), *Pleisomonas*

10 *shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, especies de *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, y estreptococos. Véase, 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

15 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell *et al.*, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3a. ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow *et al.*, eds., *The Merck Manual*, decimosexta edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood *et al.*, FEMS Microbiology Immunology, 76: 121-134 (1991); y Marrack *et al.*, Science, 248: 705-711

20 (1990), cuyo contenido se incorpora enteramente en la presente como referencia.

Los compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpo anti-IL-12 de la presente invención, pueden comprender además por lo menos

uno de cualquier auxiliar adecuado tal como, pero no limitado a, diluyente, aglutinante, estabilizador, reguladores de pH, sales, solventes lipofílicos, conservador, adyuvante, o similares. Se prefieren auxiliares farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitativos de dichas soluciones  
5 estériles, y métodos de preparación de las mismas, son bien conocidos en la técnica tales como, pero no limitados a, Gennaro, ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, decimoctava edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Pueden seleccionarse habitualmente vehículos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad  
10 y/o estabilidad de la composición de anticuerpo anti-IL-12, fragmento o variante del mismo, como es bien sabido en la técnica o como se describe en la presente.

Excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen, pero no están limitados a, proteínas, péptidos,  
15 aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, que incluyen monosacáridos, dioligosacáridos, trioligosacáridos, tetraoligosacáridos y polisacáridos; azúcares derivatizados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados, y similares; y polímeros de polisacáridos o azúcar), los cuales pueden estar presentes individualmente o en combinación,  
20 comprendiendo sólo o en combinación 1-99.99% en peso o volumen. Ejemplos de excipientes de proteínas incluyen albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Componentes de anticuerpos/aminoácidos

representativos, que pueden funcionar también en una capacidad reguladora de pH, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame, y similares. Un aminoácido preferido es la glicina.

5                   Excipientes de carbohidratos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextrán, almidones, y similares; y  
10   alditales, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), mioinositol, y similares. Excipientes de carbohidratos preferidos para su uso en la presente invención, son manitol, trehalosa y rafinosa.

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 pueden incluir también un regulador de pH o un agente para el ajuste del pH; típicamente, el  
15   regulador de pH es una sal preparada de una base o ácido orgánico. Reguladores de pH representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o reguladores de pH de fosfato. Reguladores de pH preferidos  
20   para su uso en las presentes composiciones, son sales de ácidos orgánicos tales como citrato.

Además, las composiciones de anticuerpo anti-IL-12 de la invención pueden incluir aditivos/excipientes poliméricos tales como

polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales  
5 como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adecuados para su uso en la composición de anticuerpo anti-IL-12, porción o  
10 variante del mismo de conformidad con la invención, son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se enlistan en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", decimonovena edición, Williams & Williams (1995), y en "Physician's Desk Reference", quincuagésima segunda edición, Medical Economics, Montvale, NJ (1998), cuya descripción se incorpora enteramente  
15 en la presente como referencia. Materiales de vehículo o excipiente preferidos son carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y reguladores de pH (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos. Un ejemplo de molécula de vehículo es el mucopolisacárido ácido hialurónico, el cual puede ser útil para suministro intraarticular.

20

### Formulaciones

Como se indicó anteriormente, la invención provee formulaciones estables, las cuales son de preferencia un regulador de pH de fosfato con

112

solución salina o una sal elegida, tales como soluciones preservadas y formulaciones que contienen un conservador, así como formulaciones preservadas de uso múltiple adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 en una formulación

5 farmacéuticamente aceptable. Formulaciones preservadas contienen por lo menos un conservador conocido o seleccionado opcionalmente del grupo que consiste de por lo menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidratado),

10 alquilparabeno (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso. Cualquier concentración o mezcla adecuada puede usarse como es sabido en la técnica, tal como 0.001-5%, o cualquier escala o valor en la misma tal como,

15 pero no limitada 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 escala o valor en la misma. Ejemplos no limitativos incluyen, sin conservador, m-cresol a 0.1-2%

20 (por ejemplo, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), alcohol bencílico a 0.1-3% (por ejemplo, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), timerosal a 0.001-0.5% (por ejemplo, 0.005, 0.01), fenol a 0.001-2.0% (por ejemplo, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), alquilparabenos a 0.0005-1.0% (por ejemplo, 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 indicó anteriormente, la invención provee un artículo de fabricación, que comprende material de empacamiento y por lo menos un vial
- 5 que comprende una solución de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 con los reguladores de pH y/o conservadores prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en donde dicho material de empacamiento comprende una etiqueta que indica que dicha solución puede mantenerse durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más.
- 10 La invención comprende además un artículo de fabricación, que comprende material de empacamiento, un primer vial que comprende por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 liofilizado, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso o regulador de pH o conservador prescrito, en donde dicho material de empacamiento comprende una etiqueta que contiene instrucciones para que
- 15 el paciente reconstituya el anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) en el diluyente acuoso para formar una solución que puede mantenerse durante un período de 24 horas o más.

El anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) usado de conformidad con la presente invención puede producirse mediante medios

20 recombinantes, que incluyen de preparaciones transgénicas o de células de mamífero, o puede purificarse de otras fuentes biológicas, como se describe en la presente o como es sabido en la técnica.

La escala de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 en el

producto de la presente invención incluye cantidades que dan tras reconstitución, si está en un sistema húmedo/seco, concentraciones de aproximadamente 1.0 µg/ml a aproximadamente 1000 mg/ml, aunque concentraciones menores y mayores son operables, y dependen del vehículo de suministro deseado, por ejemplo, las formulaciones en solución variarán de métodos de parche transdérmico, pulmonar, transmucoso o bomba osmótica o microbomba.

De preferencia, el diluyente acuoso comprende además opcionalmente un conservador farmacéuticamente aceptable. Conservadores preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservador usado en la formulación, es una concentración suficiente para dar un efecto antimicrobiano. Dichas concentraciones dependen del conservador seleccionado, y son determinadas fácilmente por los expertos en la técnica.

Otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, reguladores de pH, antioxidantes, intensificadores y conservadores, pueden añadirse opcionalmente y de preferencia al diluyente. Un agente de isotonicidad, tal como glicerina, se usa comúnmente a concentraciones conocidas. Un regulador de pH fisiológicamente tolerado se añade de preferencia para proveer control mejorado del pH. Las formulaciones pueden

115

abarcando una amplia gama de valores de pH, tales como pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, y escalas preferidas de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, y una escala muy preferida de pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 8.0. De preferencia, las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre aproximadamente 6.8 y aproximadamente 7.8. Reguladores de pH preferidos incluyen reguladores de pH de fosfato, más preferiblemente fosfato de sodio, en particular solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS).

Otros aditivos, tales como un solubilizador farmacéuticamente aceptable tal como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno) y PEG (polietilenglicol) o agentes tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 ó 188, polioles Pluronic®, otros copolímeros de bloque y quelantes tales como EDTA y EGTA, pueden añadirse opcionalmente a las formulaciones o composiciones para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa un contenedor de plástico o bomba para administrar la formulación. La presencia de un agente tensioactivo farmacéuticamente aceptable, mitiga la propensión de la proteína a agregarse.

Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende mezclar por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 y un conservador seleccionado del grupo que consiste

de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso. El

5   mezclado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 y un conservador en un diluyente acuoso, se lleva a cabo usando procedimientos de mezclado y disolución convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 en solución regulada en su pH, se combina con el conservador deseado en una

10   solución regulada en su pH en cantidades suficientes para proveer la proteína y el conservador a las concentraciones deseadas. Variaciones de este procedimiento serían reconocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el orden en que los componentes se añaden, si se usan aditivos adicionales, y la temperatura y el pH a los cuales la formulación se prepara, son factores que

15   pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración usados.

Las formulaciones reclamadas pueden proveerse a los pacientes como soluciones claras o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 que es reconstituido con un

20   segundo vial que contiene agua, un conservador y/o excipientes, de preferencia un regulador de pH de fosfato y/o solución salina y una sal seleccionada, en un diluyente acuoso. Un vial de solución individual o vial doble que requiera reconstitución, puede reutilizarse veces múltiples, y puede



bastar para ciclos individuales o múltiples de tratamiento del paciente, y de esta manera puede proveer un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Los presentes artículos de fabricación reclamados son útiles  
5 para administración durante un período de inmediatamente a 24 horas o más. Por consiguiente, los artículos de fabricación reclamados actualmente ofrecen ventajas significativas para el paciente. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden almacenarse con seguridad a temperaturas de aproximadamente 2 a aproximadamente 40°C, y pueden retener la actividad  
10 biológica de la proteína por períodos extendidos, permitiendo de esta manera que la etiqueta del empaque indique que la solución puede mantenerse y/o usarse durante un período de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 ó 96 horas, o más. Si se usa un diluyente preservado, dicha etiqueta puede incluir un uso de hasta 1 a 12 meses, medio año, uno y medio años y/o dos años.

15 Las soluciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 de la invención pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende mezclar por lo menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. El mezclado se lleva a cabo usando procedimientos de mezclado y disolución convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, una cantidad medida de  
20 por lo menos un anticuerpo en agua o regulador de pH se combina en cantidades suficientes para proveer la proteína y opcionalmente un conservador o regulador de pH a las concentraciones deseadas. Variaciones de este procedimiento serían reconocidas por los expertos en la técnica. Por

ejemplo, el orden en que los componentes se añaden, si se usan aditivos adicionales, y la temperatura y el pH a los cuales la formulación se prepara, son factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración usados.

- 5                    Los productos reclamados pueden proveerse a los pacientes como soluciones claras o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 que es reconstituido con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. Un vial de solución individual o vial doble que requiera reconstitución, puede reutilizarse veces múltiples, y
- 10 puede bastar para ciclos individuales o múltiples de tratamiento del paciente, y de esta manera provee un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

- Los productos reclamados pueden proveerse indirectamente a los pacientes proveyendo a farmacias, clínicas u otras de dichas instituciones
- 15 y medios, soluciones claras o viales dobles que comprendan un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 que es reconstituido con un segundo vial que contenga el diluyente acuoso. La solución clara en este caso puede ser de hasta un litro o incluso de tamaño más grande, proveyendo un gran depósito del cual porciones más pequeñas de por lo menos una solución
- 20 de anticuerpo pueden recuperarse una o veces múltiples para transferencia en viales más pequeños, y provistas por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de

viales individuales, incluyen los dispositivos de inyector de pluma para suministro de una solución, tales como BD Pens, BD Autojector<sup>®</sup>, Humaject<sup>®</sup>, NovoPen<sup>®</sup>, B-D<sup>®</sup>Pen, AutoPen<sup>®</sup> y OptiPen<sup>®</sup>, GenotropinPen<sup>®</sup>, Genotronorm Pen<sup>®</sup>, Humatro Pen<sup>®</sup>, Reco-Pen<sup>®</sup>, Roferon Pen<sup>®</sup>, Biojector<sup>®</sup>, Iject<sup>®</sup>, J-tip

5 Needle-Free Injector<sup>®</sup>, Intraject<sup>®</sup>, Medi-Ject<sup>®</sup>, por ejemplo, fabricados o desarrollados por Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, [www.bectondickinson.com](http://www.bectondickinson.com)), Disetronic (Burgdorf, Suiza, [www.disetronic.com](http://www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon ([www.bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, Reino Unido, [www.weston-medical.com](http://www.weston-medical.com)), y

10 Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, [www.mediject.com](http://www.mediject.com)), y dispositivos similarmente adecuados. Dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de vial doble, incluyen los sistemas de inyector de pluma para reconstitución de un fármaco liofilizado en un cartucho para suministro de la solución reconstituida, tal como la HumatronPen<sup>®</sup>. Ejemplos de otros

15 dispositivos adecuados incluyen jeringas pre-llenadas, autoinyectores, inyectoros libres de aguja y equipos de infusión IV libres de aguja.

Los productos reclamados actualmente incluyen material de empacamiento. El material de empacamiento provee, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones bajo las

20 cuales el producto puede usarse. El material de empacamiento de la presente invención provee instrucciones que le permiten al paciente reconstituir el anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) en el diluyente acuoso para formar una solución, y usar la solución durante un período de 2 a 24 horas o más

120

para el producto húmedo/seco de dos viales. Para el vial individual, producto en solución, la etiqueta indica que dicha solución puede usarse durante un período de 2 a 24 horas, o más. Los productos reclamados actualmente son útiles para uso del producto farmacéutico en humanos.

5 Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse mediante un procedimiento que comprende mezclar por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 y un regulador de pH seleccionado, de preferencia un regulador de pH de fosfato que contenga solución salina o una sal seleccionada. El mezclado del anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) y el  
10 regulador de pH en un diluyente acuoso, se lleva a cabo usando procedimientos de mezclado y disolución convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de por lo menos un anticuerpo en agua o regulador de pH, se combina con el agente regulador de pH deseado en agua en cantidades suficientes para proveer la proteína y el  
15 regulador de pH a las concentraciones deseadas. Variaciones de este procedimiento serían reconocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el orden en que los componentes se añaden, si se usan aditivos adicionales, y la temperatura y el pH a los cuales la formulación se prepara, son factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración  
20 usados.

Las formulaciones estables o preservadas reclamadas pueden proveerse a los pacientes como soluciones claras o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 que

es reconstituido con un segundo vial que contiene un conservador o regulador de pH y excipientes en un diluyente acuoso. Un vial de solución individual o vial doble que requiera reconstitución, puede reutilizarse veces múltiples, y puede bastar para ciclos individuales o múltiples de tratamiento del paciente, y  
5 de esta manera provee un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Otras formulaciones o métodos de estabilización del anticuerpo anti-IL-12 pueden resultar en más que una solución clara de polvo liofilizado que comprende dicho anticuerpo. Entre las soluciones no claras, están  
10 formulaciones que comprenden suspensiones en partículas, dicha materia en partículas siendo una composición que contiene al anticuerpo anti-IL-12 en una estructura de dimensión variable y conocida diversamente como una microesfera, micropartícula, nanopartícula, nanoesfera o liposoma. Dichas formulaciones en partículas esencialmente esféricas relativamente  
15 homogéneas que contienen un agente activo, pueden formarse poniendo en contacto una fase acuosa que contenga al ingrediente activo y un polímero y una fase no acuosa, seguido de evaporación de la fase no acuosa para causar la coalescencia de las partículas de la fase acuosa como se enseña en el documento U.S. 4,589,330. Pueden prepararse micropartículas porosas  
20 usando una primera fase que contenga ingrediente activo y un polímero dispersado en un solvente continuo, y removiendo dicho solvente de la suspensión mediante deshidratación por congelación o dilución-extracción-precipitación, como se describe en el documento U.S. 4,818,542. Polímeros



preferidos para dichas preparaciones, son copolímeros naturales o sintéticos o polímeros seleccionados del grupo que consiste de gelatina, agar, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágena, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicolida-L(-)lactida, poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), ácido poli( $\beta$ -hidroxibutírico), óxido de polietileno, polietileno, 2-cianoacrilato de polialquilo, metacrilato de polihidroxietilo, poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxietil DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatohexano) y metacrilato de polimetilo. Polímeros particularmente preferidos, son poliésteres tales como ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicolida-L(-)lactida, poli(épsilon-caprolactona), poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y poli(épsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico). Solventes útiles para disolver el polímero y/o el ingrediente activo, incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, hexano, benceno o hexafluoroacetona sesquihidratada. El procedimiento para la dispersión de la fase que contiene ingrediente activo con una segunda fase, puede incluir forzar a presión dicha primera fase a través de un orificio en una boquilla para afectar la formación de gotas.

Formulaciones de polvo seco pueden resultar de procedimientos diferentes de la liofilización, tales como secado por aspersión o extracción con solvente mediante evaporación o mediante precipitación de una composición cristalina, seguido de uno o más pasos para remover solvente acuoso o no acuoso. La obtención de una preparación de anticuerpos secada por

aspersión, se enseña en el documento U.S. 6,019,968. Pueden producirse composiciones de polvo seco basadas en el anticuerpo, secando por aspersión soluciones o suspensiones del anticuerpo y, opcionalmente, excipientes, en un solvente bajo condiciones que provean un polvo seco  
5 respirable. Los solventes pueden incluir compuestos polares tales como agua y etanol, los cuales pueden secarse fácilmente. La estabilidad del anticuerpo puede mejorarse llevando a cabo procedimientos de secado por aspersión en ausencia de oxígeno, tal como bajo un manto de nitrógeno, o usando nitrógeno como el gas de secado. Otra formulación relativamente seca, es una  
10 dispersión de una pluralidad de microestructuras perforadas dispersadas en un medio de suspensión que comprende típicamente un propelente de hidrofluoroalcano, como se describe en el documento WO 9916419. Las dispersiones estabilizadas pueden administrarse al pulmón de un paciente usando un inhalador de dosis medida. Equipo útil en la fabricación comercial  
15 de medicamentos secados por aspersión, es fabricado por Buchi Ltd. o Niro Corp.

Por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 en las soluciones o formulaciones estables o preservadas descritas en la presente, puede administrarse a un paciente de acuerdo con la presente invención mediante  
20 una variedad de métodos de suministro que incluyen inyección SC o IM; métodos transdérmico, pulmonar, transmucoso, por implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba, u otros medios apreciados por los expertos en la técnica, son bien conocidos en la técnica.

124

### Aplicaciones terapéuticas

La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad relacionada con IL-12, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como es sabido en la técnica o como se describe en la presente, usando por lo menos un anticuerpo de IL-12 de la presente invención, por ejemplo, administrando o poniendo en contacto la célula, tejido, órgano, animal o paciente con una cantidad terapéutica efectiva de anticuerpo de IL-12. La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad relacionada con IL-12, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de obesidad, una enfermedad relacionada con el sistema inmune, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad maligna o una enfermedad neurológica.

La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad inmune o relacionada con IL-12, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípidos, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de

125

Wegener, sarcoidosis, procedimientos para la reversión de orquitis/vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis alérgica por contacto, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad

5 de injerto contra hospeder, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis por Gram positivos, sepsis por Gram negativos, sepsis negativa en cultivo, sepsis micótica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de sufrimiento respiratorio del adulto,

10 artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia de células falciformes, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones de hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa,

15 enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de trasplante de riñón, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjerto de piel, rechazo de trasplante de cartílago,

20 rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de intestino delgado, rechazo de implante de timo fetal, rechazo de trasplante de paratiroides, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de

Raynoud, diabetes insulinoresistente tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal y síndrome de cambios de la piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, síndrome de cambios de la piel, síndrome antifosfolípidos, pénfigo, esclerodermia, enfermedad de tejido conectivo mixta, enfermedad de Addison idiopática, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitíligo, vasculitis, síndrome de cardiectomía post-MI, hipersensibilidad tipo IV, dermatitis por contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, sensibilidad a fármacos, enfermedad de Wilson metabólica/idiopática, hemacromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotalámico-pituitaria-suprarrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), linfocitosis hematofagocítica familiar, condiciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, terapia de okt3, terapia anti-cd3, terapia con citocinas, quimioterapia, radioterapia (por ejemplo, incluyendo, pero no limitada a, tostenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación crónica por salicilato, y similares. Véase, por ejemplo, the Merck Manual, decimosegunda a

decimoséptima ediciones, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), *Pharmacotherapy Handbook*, Wells *et al.*, eds., segunda edición, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), cada una incorporada enteramente en la presente como referencia.

- 5                   La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de síndrome de choque cardiaco, infarto al miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, apoplejía, apoplejía isquémica,
- 10   hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, restenosis, enfermedad arteriosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, choque, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardiaca, cor pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardiacas, latidos ectópicos auriculares, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o
- 15   paroxismal), síndrome de post-perfusión, respuesta inflamatoria de derivación cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia de QRS estrecho regular, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz de His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo de rama fascicular, trastornos isquémicos miocárdicos, enfermedad de arteria coronaria, angina de pecho,
- 20   infarto al miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, cardiomiopatía restrictiva, enfermedades cardiacas valvulares, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardiacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus

ramas, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad aterosclerótica periférica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas  
 5 varicosas, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome de post-bomba, lesión por isquemia-reperfusión, y similares. Dicho método puede comprender opcionalmente la administración de una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano,  
 10 animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia.

La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad infecciosa relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de: infección bacteriana  
 15 aguda o crónica, procesos parasitarios o infecciosos agudos y crónicos, que incluyen infecciones bacterianas, virales y micóticas, infección por VIH/neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (por ejemplo, A, B o C, o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, 0.157:h7 de *E. coli*, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria,  
 20 dengue, fiebre hemorrágica, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* intracelular, neumonía por *Pneumocystis carinii*, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, *Legionella*, enfermedad

de Lyme, influenza a, virus de Epstein-Barr, síndrome hemofagocítico asociado a virus, meningitis aséptica/encefalitis viral, y similares.

La presente invención provee también un método para la modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad maligna relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica aguda, FAB ALL de células B o células T, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de malignidad, tumores sólidos, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer no de poliposis hereditaria, linfoma de Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, cáncer testicular, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con cáncer, dolor óseo relacionado con cáncer, y similares.

La presente invención provee también un método para la

modulación o el tratamiento de por lo menos una enfermedad neurológica relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que incluye, pero no está limitada a, por lo menos una de: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, migraña, dolor de cabeza, complejo

5 de demencia-SIDA, enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple y mielitis transversal aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelares tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelares; trastornos de movimiento hiperkinético, tales como corea de Huntington y corea senil; trastornos de movimiento inducidos

10 por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos de movimiento hipocinético, tales como enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares,

15 degeneración de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia telangiectasia y trastorno de sistemas múltiples mitocondriales); trastornos de núcleo desmielinizante, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversal aguda; y trastornos de la unidad motora, tales

20 como atrofas musculares neurogénicas (degeneración de células del asta anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; síndrome de Down en edad intermedia; enfermedad del cuerpo de Lewy difusa;

demencia senil o tipo del cuerpo de Lewy; síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz; demencia pugilística; lesión neurotraumática (por ejemplo, lesión de médula espinal, 5 lesión cerebral, concusión, concusión repetitiva); dolor; dolor inflamatorio; autismo; depresión; apoplejía; trastornos cognitivos; epilepsia; y similares. Dicho método puede comprender opcionalmente administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprenda por lo menos un anticuerpo de FNT o porción o variante especificada del mismo, a 10 una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia. Véase, por ejemplo, the Merck Manual, decimosexta edición, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

La presente invención provee también un método para modular o tratar por lo menos una herida, trauma o lesión de tejido relacionado con IL- 15 12, o condición crónica relacionada con IL-12, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, por lo menos uno de: lesión del cuerpo o un trauma asociado con cirugía oral, incluyendo cirugía periodontal, extracciones de dientes, tratamiento endodóncico, inserción de implantes de dientes o aplicación y uso de prótesis de dientes; o en donde la 20 herida se selecciona del grupo que consiste de heridas asépticas, heridas contusas, heridas incisas, heridas laceradas, heridas no penetrantes, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas por pinchazo, heridas sépticas, infartos y heridas subcutáneas; o en donde la herida se

132

selecciona del grupo que consiste de úlceras isquémicas, úlceras por presión, fístulas, picaduras o mordeduras severas, quemaduras térmicas y heridas del sitio donador; o en donde la herida es una herida aftosa, una herida traumática o una herida asociada con herpes.

5 Las heridas y/o úlceras se encuentran normalmente sobresaliendo de la piel o sobre una superficie de mucosa o como resultado de un infarto en un órgano ("apoplejía"). Una herida puede ser un resultado de un defecto de tejido blando o una lesión o de una condición subyacente. En el presente contexto, el término "piel" se refiere a la superficie más exterior del  
10 cuerpo de un animal, incluyendo un humano, y abarca piel intacta o casi intacta, así como una superficie lesionada de la piel. El término "mucosa" se refiere a mucosa dañada o no dañada de un animal, tal como un humano, y puede ser la mucosa oral, bucal, aural, nasal, pulmonar, ocular, gastrointestinal, vaginal o rectal.

15 En el presente contexto, el término "herida" denota una lesión del cuerpo con interrupción de la integridad normal de estructuras de tejido. Se pretende también que el término abarque los términos "llaga", "lesión", "necrosis" y "úlceras". Normalmente, el término "llaga" es un término popular para casi cualquier lesión de la piel o membranas de mucosas, y el término  
20 "úlceras" es un defecto local, o excavación, de la superficie de un órgano o tejido, que se produce por el desprendimiento de tejido necrótico. El término lesión se refiere en general a cualquier defecto de tejido. El término necrosis se refiere a tejido muerto que resulta de infección, lesión, inflamación o

infartos.

El término “herida” usado en el presente contexto denota cualquier herida (véase más adelante para una clasificación de heridas), y en cualquier etapa particular en el proceso de curación, incluyendo la etapa antes

5 de que cualquier curación se haya iniciado, o incluso antes de que se haga una herida específica tal como una incisión quirúrgica (tratamiento profiláctico). Ejemplos de heridas que pueden prevenirse y/o tratarse de conformidad con la presente invención son, por ejemplo, heridas asépticas, heridas contusas, heridas incisas, heridas laceradas, heridas no penetrantes

10 (es decir, heridas en las cuales no existe disolución de la piel, pero existe lesión a estructuras subyacentes), heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas por pinchazo, heridas sépticas, heridas subcutáneas, etc. Ejemplos de úlceras son úlceras por decúbito, úlceras por cáncer, úlceras por cromo, úlceras por frío, úlceras por presión, etc. Ejemplos

15 de úlceras son, por ejemplo, una úlcera péptica, úlcera duodenal, úlcera gástrica, úlcera gotosa, úlcera diabética, úlcera isquémica hipertensiva, úlcera por estasis, *ulcus cruris* (úlcera venosa), úlcera sublingual, úlcera submucosa, úlcera sintomática, úlcera trófica, úlcera tropical y úlcera venérea, por ejemplo, causada por gonorrea (incluyendo uretritis, endocervicitis y proctitis).

20 Condiciones relacionadas con heridas o úlceras que pueden tratarse exitosamente de conformidad con la presente invención son quemaduras, ántrax, tétanos, gangrena gaseosa, escarlatina, erisipelas, *sycosis barbae* (foliculitis pustular), foliculitis, impétigo contagioso o impétigo ampollar, etc.

Existe con frecuencia un cierto traslape entre el uso de los términos “herida” y “úlceras” y “herida” y “llaga” y, además, los términos se usan con frecuencia al azar. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, en el presente contexto, el término “herida” abarca los términos “úlceras”, “lesión”, “llaga” e “infarto”, y

5 los términos se usan indiscriminadamente a menos que se indique de otra manera.

Los tipos de heridas que se tratarán de conformidad con la invención incluyen también (i) heridas generales tales como, por ejemplo, heridas quirúrgicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, térmicas, químicas y

10 bullosas; (ii) heridas específicas para la cavidad oral tales como, por ejemplo, heridas post-extracción, heridas endodónticas especialmente en relación con el tratamiento de quistes y abscesos, úlceras y lesiones de origen bacteriano, viral o autoinmunológico, lesiones mecánicas, químicas, térmicas, infecciosas y liquenoides; úlceras por herpes, estomatitis aftosa, gingivitis ulcerosa

15 necrosante aguda y síndrome de ardor de la boca; y (iii) heridas sobre la piel tales como, por ejemplo, neoplasma, quemaduras (por ejemplo, químicas, térmicas), lesiones (bacterianas, virales autoinmunológicas), picaduras e incisiones quirúrgicas. Otra forma de clasificación de las heridas es como (i) pérdida pequeña de tejido debida a incisiones quirúrgicas, abrasiones

20 menores y picaduras menores, o como (ii) pérdida significativa de tejido. El último grupo incluye úlceras isquémicas, úlceras por presión, fístulas, laceraciones, picaduras severas, quemaduras térmicas y heridas del sitio donador (en tejidos blandos y duros), e infartos.

Otras heridas que son de importancia con relación a la presente invención, son heridas tales como úlceras isquémicas, úlceras por presión, fístulas, picaduras severas, quemaduras térmicas y heridas del sitio donador. Las úlceras isquémicas y las úlceras por presión son heridas que normalmente sólo sanan muy lentamente y especialmente en dichos casos, un proceso de curación mejorado y más rápido es de hecho de gran importancia para el paciente. Además, los costos implicados en el tratamiento de pacientes que sufren de dichas heridas, son marcadamente reducidos cuando la curación es mejorada, y ocurre más rápidamente.

10 Las heridas del sitio donador son heridas que, por ejemplo, ocurren con relación a la remoción de tejido duro de una parte del cuerpo a otra parte del cuerpo, por ejemplo, con relación al trasplante. Las heridas que resultan de dichas operaciones son muy dolorosas, y una curación mejorada es por lo tanto más valiosa. El término "piel" se usa en un sentido muy amplio abarcando la capa epidérmica de la piel y – en aquellos casos en donde la superficie de la piel está más o menos lesionada – también la capa dérmica de la piel. Además del estrato córneo, la capa epidérmica de la piel es la capa exterior (epitelial), y la capa de tejido conectivo más profunda de la piel se denomina la dermis.

20 La presente invención provee también un método para modular o tratar enfermedad de Crohn, psoriasis y esclerosis múltiple, entre las otras enfermedades enlistadas anteriormente como relacionadas con IL-12, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitadas a, por lo

menos una de enfermedad relacionada con el sistema inmune, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, maligna y/o neurológica. Dicho método puede comprender opcionalmente administrar una cantidad efectiva de por lo menos una composición o composición farmacéutica que comprenda por lo

5 menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia.

Cualquier método de la presente invención puede comprender la administración de una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprenda por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 a una

10 célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método puede comprender además opcionalmente la co-administración o terapia de combinación para el tratamiento de dichas enfermedades o trastornos, en donde la administración de dicho anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno), porción o variante

15 especificada del mismo, comprende además la administración antes de, concurrentemente con y/o después de, por lo menos uno seleccionado de por lo menos uno de antagonista de FNT (por ejemplo, pero no limitado a, un antagonista de proteína o químico de FNT), fragmento o anticuerpo monoclonal o policlonal de FNT, un fragmento o receptor de FNT soluble (por

20 ejemplo, p55, p70 o p85), polipéptidos de fusión del mismo, o un antagonista de FNT de molécula pequeña, por ejemplo, proteína de unión a FNT I o II (TBP-I o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, entercept, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, y similares, un antirreumático (por ejemplo,

metotrexato, auranofín, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato  
 sódico de oro, sulfato de hidroxyclorequina, leflunomida, sulfasalzina), un  
 relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroidal  
 (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un  
 5 bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido,  
 un antimicótico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina,  
 una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una  
 tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriático, un corticosteroide, un  
 esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un  
 10 nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con  
 calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un  
 laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, eritropoyetina  
 alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-  
 CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor  
 15 (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de  
 crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un modulador del  
 receptor de estrógeno, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un  
 antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo,  
 agente antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un  
 20 simpaticomimético, un estimulante, donepecilo, tacrina, una medicación para  
 el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno,  
 una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo de la misma,  
 dornase alfa (Pulmozyme), una citocina o antagonista de citocina.

Dosificaciones adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al.*, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, segunda edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, edición de lujo, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000); *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, vigésima primera edición, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; y *Health Professional's Drug Guide 2001*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ, cada una de las cuales se incorpora enteramente en la presente como referencia.

- 10                    Antagonistas de FNT adecuados para composiciones, terapia de combinación, co-administración, dispositivos y/o métodos de la presente invención (comprendiendo además por lo menos un anticuerpo, porción o variante especificada del mismo, de la presente invención) incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos anti-FNT, fragmentos de unión a antígeno de
- 15 los mismos, y moléculas receptoras que se unen específicamente al FNT; compuestos que previenen y/o inhiben la síntesis de FNT y la liberación del FNT o su acción sobre células objetivo, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de adenosina A2b e intensificadores del receptor de adenosina
- 20 A2b; compuestos que previenen y/o inhiben la señalización del receptor de FNT, tales como inhibidores de proteína cinasa activados por mitógeno (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la digestión del FNT de membrana, tales como inhibidores de metaloproteinasas; compuestos que

bloquean y/o inhiben la actividad del FNT, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o síntesis del FNT, tales como inhibidores de MAP cinasa.

5                    Como se usa en la presente, un “anticuerpo del factor de necrosis tumoral”, “anticuerpo de FNT”, “anticuerpo de FNT $\alpha$ ”, o fragmento, y similares del mismo, disminuye, bloquea, inhibe, suprime o interfiere con la actividad del FNT $\alpha$  *in vitro*, *in situ* y/o de preferencia *in vivo*. Por ejemplo, un anticuerpo humano de FNT adecuado de la presente invención puede unirse  
10 al FNT $\alpha$ , e incluye anticuerpos anti-FNT, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y mutantes o dominios especificados de los mismos que se unen específicamente al FNT $\alpha$ . Un anticuerpo o fragmento de FNT adecuado puede también disminuir, bloquear, suprimir, interferir, prevenir y/o inhibir la síntesis de ARN, ADN o proteína del FNT, liberación del FNT, señalización del  
15 receptor del FNT, digestión del FNT de membrana, actividad del FNT y producción y/o síntesis del FNT.

Un ejemplo de un anticuerpo o antagonista del FNT es el anticuerpo quimérico cA2. Otros ejemplos de anticuerpos anti-FNT monoclonales que pueden usarse en la presente invención, se describen en la  
20 técnica (véase, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 5,231,024; Möller, A. *et al.*, *Cytokine* 2(3): 162-169 (1990); solicitud de E.U.A. No. 07/943,852 (presentada en septiembre 11 de 1992); Rathjen *et al.*, publicación internacional No. WO 91/02078 (publicada en febrero 21 de 1991); Rubin *et al.*, publicación de

patente EPO No. 0 218 868 (publicada en abril 22 de 1987); Yone *et al.*, publicación de patente EPO No. 0 288 088 (octubre 26 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);  
 5 Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6: 489-507 (1987); y Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96: 57-62 (1987), citas que se incorporan enteramente en la presente como referencia).

#### Moléculas del receptor del FNT

10 Moléculas del receptor del FNT preferidas útiles en la presente invención, son las que se unen al FNT $\alpha$  con alta afinidad (véase, por ejemplo, Feldmann *et al.*, publicación internacional WO 92/07076 (publicada en abril 30 de 1992); Schall *et al.*, *Cell* 61: 361-370 (1990); y Loetscher *et al.*, *Cell* 61: 351-359 (1990), cuyas referencias se incorporan enteramente en la presente  
 15 como referencia) y que poseen opcionalmente baja inmunogenicidad. En particular, los receptores del FNT de 55 kDa (FNT-R p55) y de 75 kDa (FNT-R p75) de la superficie de la célula, son útiles en la presente invención. Formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares (ECD) de los receptores o porciones funcionales de los mismos (véase, por  
 20 ejemplo, Corcoran *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 223: 831-840 (1994)), son también útiles en la presente invención. Formas truncadas de los receptores del FNT, que comprenden el ECD, se han detectado en orina y suero como proteínas de unión inhibitoras del FNT $\alpha$  de 30 kDa y 40 kDa (Engelmann, H. *et al.*, *J.*

141

*Biol. Chem.* 265: 1531-1536 (1990)). Moléculas multiméricas del receptor del FNT y moléculas de fusión inmunorreceptoras del FNT, y derivados y fragmentos o porciones de las mismas, son otros ejemplos de moléculas del receptor del FNT que son útiles en los métodos y las composiciones de la presente invención.

Moléculas multiméricas del receptor del FNT útiles en la presente invención, comprenden el ECD completo o una porción funcional del mismo de dos o más receptores del FNT enlazados mediante uno o más enlazadores polipeptídicos u otros enlazadores no peptídicos, tales como polietilenglicol (PEG). Un ejemplo de dicha molécula de fusión del inmunorreceptor del FNT, es la proteína de fusión de IgG/receptor del FNT. Moléculas de fusión del inmunorreceptor del FNT, y 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 E.U.A. No. 5,447,851; y solicitud de E.U.A. 08/442,133 (presentada en mayo 16 de 1995), cuyas referencias se incorporan enteramente en la presente como referencia).

Métodos para la producción de moléculas de fusión del inmunorreceptor pueden encontrarse también en Capon *et al.*, patente de E.U.A. No. 5,116,964; Capon *et al.*, patente de E.U.A. No. 5,225,538; y Capon *et al.*, *Nature* 337: 525-531 (1989), cuyas referencias se incorporan enteramente en

142

la presente como referencia.

Las citocinas incluyen cualquier citocina conocida. Véase, por ejemplo, CopewithCytokines.com. Antagonistas de citocinas incluyen, pero no están limitados a, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier  
5 receptor, fragmento o mimético soluble, cualquier antagonista de molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos.

### Tratamientos terapéuticos

Cualquier método de la presente invención puede comprender  
10 un método para el tratamiento de un trastorno mediado por IL-12, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita de dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método puede comprender además  
15 opcionalmente co-administración o terapia de combinación para el tratamiento de dichas enfermedades o trastornos, en donde la administración de dicho anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno), porción o variante especificada del mismo, comprende además administrar antes de, concurrentemente con, y/o después de, por lo menos uno seleccionado de un fármaco antiinfeccioso, un  
20 fármaco para el sistema cardiovascular (CV), un fármaco para el sistema nervioso central (SNC), un fármaco para el sistema nervioso autónomo (SNA), un fármaco para el tracto respiratorio, un fármaco para el tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el balance de

fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco de inmunomodulación, un fármaco oftálmico, ótico o nasal, un fármaco tópico, un fármaco nutricional, o similares, por lo menos un antagonista del FNT (por ejemplo, pero no limitado a, un anticuerpo o fragmento del FNT, un receptor o  
5 fragmento del FNT soluble, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista del FNT de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxycloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroidal  
10 (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antimicótico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriático, un corticosteroide, un  
15 esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, eritropoyetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-  
20 CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un modulador del receptor de estrógeno, un midriático, un cicloplégico, un agente alquilante, un

antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepecilo, tacrina, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno,

5 una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo de la misma, dornase alfa (Pulmozyme), una citocina o un antagonista de citocina. Dichos fármacos son bien conocidos en la técnica, y se incluyen formulaciones, indicaciones, dosificación y administración para cada uno presentado en la presente (véase, por ejemplo, Nursing 2001 Handbook of Drugs, vigésima

10 primera edición, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; y Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, cada una incorporada enteramente en la presente como referencia).

15 Típicamente, el tratamiento de condiciones patológicas se efectúa administrando una cantidad o dosificación efectiva de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 que en total, en promedio, varía de por lo menos aproximadamente 0.01 a 500 miligramos de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 por kilogramo de paciente por dosis, y de preferencia de

20 por lo menos aproximadamente 0.1 a 100 miligramos de anticuerpo/kilogramo de paciente por administración individual o múltiple, dependiendo de la actividad específica contenida en la composición. En forma alternativa, la concentración en suero efectiva puede comprender de 0.1-5000  $\mu\text{g/ml}$  por

administración individual o múltiple. Dosificaciones adecuadas son conocidas por los médicos generales y dependerán, de hecho, del estado de enfermedad particular, la actividad específica de la composición que se está administrando, y el paciente particular que está sufriendo el tratamiento. En algunos casos, para obtener la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proveer administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis monitoreada o medida particular, en donde las administraciones individuales se repiten hasta que se obtenga la dosis diaria o el efecto deseado.

10 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, 15 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 escala, valor o fracción de la misma, o para obtener 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, 20, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 20 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, 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  $\mu\text{g/ml}$  de concentración en suero por administración individual o múltiple, o cualquier escala, valor o fracción de la misma.

- 5 En forma alternativa, la dosificación administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; edad, salud y peso del receptor; naturaleza y grado de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado.
- 10 Usualmente, una dosificación de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0.1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. A menudo, de 0.1 a 50, y de preferencia de 0.1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en una forma de liberación sostenida, son efectivos para lograr los resultados deseados.
- 15 Como un ejemplo no limitativo, el tratamiento de humanos o animales puede proveerse como una dosificación de una vez o dosificación periódica de por lo 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, 20 70, 80, 90 ó 100 mg/kg, por día, en por lo menos uno 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 en forma alternativa o además, por lo menos una de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

147

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 en  
forma alternativa o además, por lo 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  
5 mismos, usando dosis individuales, de infusión o repetidas.

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para  
administración interna, contienen en general de aproximadamente 0.001  
miligramos a aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por  
unidad o contenedor. En estas composiciones farmacéuticas, el ingrediente  
10 activo estará presente a menudo en una cantidad de aproximadamente 0.5-  
99.999% en peso, con base en el peso total de la composición.

Para administración parenteral, el anticuerpo puede formularse  
como una solución, suspensión, emulsión, partícula, polvo o polvo liofilizado  
en asociación, o provisto por separado, con un vehículo parenteral  
15 farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de dichos vehículos son agua,  
solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero  
humano a 1-10%. Pueden usarse también liposomas y vehículos no acuosos  
tales como aceites fijados. El vehículo o polvo liofilizado puede contener  
aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol)  
20 y estabilidad química (por ejemplo, reguladores de pH y conservadores). La  
formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en la edición  
más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de

referencia estándar en este campo.

### Administración alternativa

Muchos modos de administración conocidos y desarrollados  
5 pueden usarse de conformidad con la presente invención, para administrar  
cantidades farmacéuticamente efectivas de por lo menos un anticuerpo anti-  
IL-12 de conformidad con la presente invención. Aunque la administración  
pulmonar se usa en la siguiente descripción, otros modos de administración  
pueden usarse de conformidad con la presente invención con resultados  
10 adecuados. Los anticuerpos de IL-12 de la presente invención pueden  
suministrarse en un vehículo, como una solución, emulsión, coloide o  
suspensión, o como un polvo seco, usando cualquiera de una variedad de  
dispositivos y métodos adecuados para administración mediante inhalación u  
otros modos descritos en la presente o conocidos en la técnica.

15

### Formulaciones parenterales y su administración

Las formulaciones para administración parenteral pueden  
contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina,  
polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal,  
20 naftalenos hidrogenados, y similares. Pueden prepararse suspensiones  
acuosas u oleosas para inyección usando un emulsificador o humidificador  
adecuado y un agente de suspensión, de acuerdo a métodos conocidos.

Agentes para inyección pueden ser un agente de dilución no tóxico, no administrable oralmente, tal como una solución acuosa o una solución inyectable estéril o suspensión en un solvente. Como el vehículo o solvente que puede usarse, se permiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como un solvente ordinario, o solvente de suspensión, puede usarse un aceite no volátil estéril. Para estos propósitos, puede usarse cualquier tipo de aceite no volátil y ácido graso, incluyendo ácidos grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; y monoglicéridos o diglicéridos o triglicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero no está limitada a, medios de inyección convencionales, un dispositivo de inyección sin aguja presurizado con gas, como se describe en la patente de E.U.A. No. 5,851,198, y un dispositivo perforador de láser como se describe en la patente de E.U.A. No. 5,839,446, incorporada enteramente en la presente como referencia.

#### Suministro alternativo

La invención se refiere además a la administración de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 mediante administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelíaca, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica,

intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, o por medios transdérmicos. Por lo menos una composición de

5 anticuerpo anti-IL-12 puede prepararse para su uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa), o cualquier otro modo de administración, en particular en la forma de suspensiones o soluciones líquidas; para uso en administración vaginal o rectal, en particular en formas semisólidas tales como, pero no limitadas a, cremas y supositorios; para

10 administración bucal o sublingual tal como, pero no limitada a, en la forma de tabletas o cápsulas; o intranasalmente tal como, pero no limitada a, la forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o transdérmicamente tal como, pero no limitada a, un gel, ungüento, loción, suspensión o sistema de suministro por parche con intensificadores químicos tales como sulfóxido

15 de dimetilo, para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración del fármaco en el parche transdérmico (véase Junginger, *et al.*, en "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, incorporada enteramente en la presente como referencia), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de

20 formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (véase documento WO 98/53847), o la aplicación de campos eléctricos que crean vías de transporte transitorias tales como electroporación, o que aumentan la movilidad de fármacos cargados a través de la piel tales como iontoforesis, o

la aplicación de ultrasonido tal como sonoforesis (véase las patentes de E.U.A. Nos 4,309,989 y 4,767,402) (las publicaciones y patentes anteriores siendo incorporadas enteramente en la presente como referencia).

5                    Administración pulmonar/nasal

Para administración pulmonar, de preferencia por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 se suministra en un tamaño de partícula efectivo para alcanzar las vías respiratorias inferiores del pulmón o senos. De conformidad con la invención, por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 puede  
10    suministrarse mediante cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación o nasales conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar formulaciones dispersadas en un gas en los alvéolos o la cavidad de los senos de un paciente, incluyen inhaladores de dosis medida, nebulizadores,  
15    generadores de polvo seco, atomizadores, y similares. Otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos, se conocen también en la técnica. Dichos dispositivos pueden usar formulaciones adecuadas para administración, para la dispensación de anticuerpos en un aerosol. Dichos aerosoles pueden comprender soluciones (acuosas y no  
20    acuosas) o partículas sólidas.

Inhaladores de dosis medida tales como el inhalador de dosis medida Ventolin<sup>®</sup>, usan típicamente un gas propelente, y requieren accionamiento durante la inspiración (véase, por ejemplo, los documentos WO

152

94/16970 y WO 98/35888). Inhaladores de polvo seco tales como Turbuhaler<sup>TM</sup> (Astra), Rotahaler<sup>®</sup> (Glaxo), Diskus<sup>®</sup> (Glaxo), inhalador Spiros<sup>TM</sup> (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador de polvo Spinhaler<sup>®</sup> (Fisons), usan accionamiento por respiración de un polvo mixto (véase los documentos US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, citas incorporadas enteramente en la presente como referencia). Nebulizadores tales como AERx<sup>TM</sup> Aradigm, el nebulizador Ultravent<sup>®</sup> (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II<sup>®</sup> (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), las referencias anteriores siendo incorporadas enteramente en la presente como referencia, producen aerosoles de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, etc., generan aerosoles de partículas pequeñas. Se pretende que estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles comercialmente sean representativos de dispositivos específicos adecuados para la práctica de esta invención, y no se pretende que limiten el alcance de la misma.

De preferencia, una composición que comprenda por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 se suministra mediante un inhalador de polvo seco o un atomizador. Existen varias características deseables de un dispositivo de inhalación para la administración de por lo menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, el suministro mediante el dispositivo de inhalación, es en forma ventajosa confiable, reproducible y precisa. El

dispositivo de inhalación puede suministrar opcionalmente partículas secas pequeñas, por ejemplo, menores de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia de aproximadamente 1 a 5  $\mu\text{m}$ , para buena respirabilidad.

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

Un aerosol que incluya una composición de anticuerpo de IL-12, puede producirse forzando una suspensión o solución de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 a través de una boquilla bajo presión. Pueden elegirse el  
10 tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada y la velocidad de alimentación del líquido, para lograr el resultado y el tamaño de partícula deseados. Puede producirse una electroaspersión, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con una alimentación por boquilla o capilar. En forma ventajosa, las partículas de por lo menos una composición de  
15 anticuerpo anti-IL-12 suministrada mediante un atomizador, tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia en la escala de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .

Formulaciones de por lo menos una composición de anticuerpo  
20 anti-IL-12 adecuadas para su uso con un atomizador, incluyen típicamente una composición de anticuerpo en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 100 mg de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 por ml de solución o mg/gm, o cualquier

154

escala o valor en la misma, por ejemplo, pero no limitada 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 o mg/gm. La formulación puede incluir agentes tales como un

5 excipiente, un regulador de pH, un agente de isotonicidad, un conservador, un agente tensioactivo y, de preferencia, zinc. La formulación puede incluir también un excipiente o agente para la estabilización de la composición de anticuerpo, tal como un regulador de pH, un agente reductor, una proteína global o un carbohidrato. Proteínas globales útiles en la formulación de las

10 composiciones de anticuerpo, incluyen albúmina, protamina, o similares. Carbohidratos típicos útiles en la formulación de composiciones de anticuerpo, incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de la composición de anticuerpo puede incluir también un agente tensioactivo, el cual puede reducir o prevenir la agregación, inducida por la

15 superficie, de la composición de anticuerpo causada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Pueden usarse varios agentes tensioactivos convencionales, tales como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitol. Las cantidades variarán en general entre 0.001 y 14% en peso de la

20 formulación. Agentes tensioactivos especialmente preferidos para los propósitos de esta invención, son monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. Otros agentes conocidos en la técnica para la formulación de una proteína, tales como anticuerpos de IL-12,



o porciones o variantes especificadas de los mismos, pueden incluirse también en la formulación.

#### Administración de composiciones de anticuerpo de IL-12

##### 5 mediante un nebulizador

Pueden administrarse composiciones 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 que crea un chorro de aire de alta velocidad a través de un  
10 orificio. Conforme el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de baja presión, que extrae una solución de la composición de anticuerpo a través de un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. La corriente de líquido del tubo capilar es dividida en filamentos y gotas inestables conforme sale del tubo, creando el aerosol. Una gama de  
15 configuraciones, velocidades de flujo y tipos de deflector, puede usarse para lograr las características de desempeño deseadas de un nebulizador de chorro determinado. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia que crea energía mecánica vibracional, usando típicamente un transductor piezoeléctrico. Esta energía es transmitida a la formulación de  
20 la composición de anticuerpo ya sea directamente o a través de un fluido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la composición de anticuerpo. En forma ventajosa, las partículas de la composición de anticuerpo suministradas mediante un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor

156

de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia en la escala de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12

5 adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, incluyen típicamente una concentración de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 100 mg de por lo menos una proteína de anticuerpo anti-IL-12 por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un regulador de pH, un agente de isotonicidad, un conservador, un

10 agente tensioactivo y, de preferencia, zinc. La formulación puede incluir también un excipiente o agente para la estabilización de la composición de anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno), tal como un regulador de pH, un agente reductor, una proteína global o un carbohidrato. Proteínas globales útiles en la formulación de las composiciones de anticuerpo (por lo menos

15 uno), incluyen albúmina, protamina, o similares. Carbohidratos típicos útiles en la formulación de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de la composición de anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) puede incluir también un agente tensioactivo, el cual puede reducir o prevenir la agregación,

20 inducida por la superficie, del anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) causada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Pueden usarse varios agentes tensioactivos convencionales, tales como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso

de polioxietileno sorbitol. Las cantidades variarán en general entre 0.001 y 4% en peso de la formulación. Agentes tensioactivos especialmente preferidos para los propósitos de esta invención, son monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. Otros agentes conocidos en la técnica para la formulación de una proteína, tales como una proteína de anticuerpo, pueden incluirse también en la formulación.

Administración de composiciones de anticuerpo de IL-12 mediante un inhalador de dosis medida

10                    En un inhalador de dosis medida (MDI), un propelente, por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, y cualquier excipiente u otros aditivos, están contenidos en un recipiente como una mezcla que incluye un gas comprimido licuado. El accionamiento de la válvula dosificadora libera la mezcla como un aerosol, que contiene de preferencia partículas en la escala de tamaño de  
15    menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de preferencia de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula de aerosol deseado, puede obtenerse usando una formulación de composición de anticuerpo producida mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, que  
20    incluyen molienda de chorro, secado por aspersion, condensación de punto crítico, o similares. Inhaladores de dosis medida preferidos incluyen los fabricados por 3M o Glaxo, y que usan un propelente de hidrofluorocarbono.

Las formulaciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida, incluirán en general un polvo finamente dividido que contiene por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un  
5 propelente con ayuda de un agente tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional usado para este propósito, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, que incluye triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a  
10 (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similares. De preferencia, el propelente es un hidrofluorocarbono. El agente tensioactivo puede elegirse para estabilizar el anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) como una suspensión en el propelente, para proteger al agente activo contra la degradación química, y similares. Agentes tensioactivos adecuados  
15 incluyen trioleato de sorbitán, lecitina de soya, ácido oleico, o similares. En algunos casos, se prefieren aerosoles en solución que usan solventes tales como etanol. Agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como una proteína, pueden incluirse también en la formulación. El experto en la técnica reconocerá que los métodos de la  
20 presente invención pueden lograrse mediante la administración pulmonar de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-12 mediante dispositivos no descritos en la presente.

Formulaciones orales y su administración

Las formulaciones para administración oral dependen de la co-administración de un adyuvante (por ejemplo, resorcinoles y agentes tensioactivos no iónicos tales como éter oleílico de polioxietileno y éter de n-hexadecilpolietileno) que aumentan artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la co-administración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFF) y trasilol), que inhiben la degradación enzimática. Formulaciones para el suministro de agentes hidrofílicos que incluyen proteínas y anticuerpos y una combinación de por lo menos dos agentes tensioactivos destinados para administración oral, bucal, por mucosas, nasal, pulmonar, vaginal, transmembrana o rectal, se enseñan en el documento U.S. 6,309,663. El compuesto constituyente activo de la forma de dosificación tipo sólido para administración oral puede mezclarse con por lo menos un aditivo, que incluye sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrán, almidones, agar, alginatos, quitinas, quitosanes, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágena, caseína, albúmina, polímero sintético o semisintético y glicéridos. Estas formas de dosificación pueden contener también otros tipos de aditivos, por ejemplo, agente de dilución inactivo, lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, agente conservador tal como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidante tal como cisteína, desintegrador, aglutinante, espesante, agente regulador de pH, agente edulcorante, agente saborizante, agente de perfume,

etc.

Las tabletas y píldoras pueden procesarse además en preparaciones con recubrimiento entérico. Las preparaciones líquidas para administración oral incluyen preparaciones de emulsión, jarabe, elixir, suspensión y solución permisibles para uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes de dilución inactivos usados a menudo en dicho campo, por ejemplo, agua. Se han descrito también liposomas como sistemas de suministro de fármacos para insulina y heparina (véase patente de E.U.A. No. 4,239,754). Más recientemente, se han usado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (protenoides) para suministrar agentes farmacéuticos (véase patente de E.U.A. No. 4,925,673). Además, se usan compuestos de vehículos descritos en las patentes de E.U.A. No. 5,879,681 y No. 5,587,175 para suministrar oralmente agentes biológicamente activos, como es sabido en la técnica.

15

#### Formulaciones para mucosas y su administración

Una formulación para administrar oralmente un agente bioactivo encapsulado en uno o más excipientes de polímero o copolímero biocompatibles, de preferencia un polímero o copolímero biodegradable, da microcápsulas que debido al tamaño adecuado de las microcápsulas resultantes, resulta en el agente que llega a los agregados linfáticos foliculares, y es absorbido por los mismos, de otra manera conocidos como el

161

“parche de Peyer” o “GALT” del animal, sin pérdida de eficacia debido al agente que ha pasado a través del tracto gastrointestinal. Agregados linfáticos foliculares similares pueden encontrarse en los tubos bronquiales (BALT) y el intestino grueso. Los tejidos descritos anteriormente son referidos en general

5 como tejidos linforreticulares asociados a mucosas (MALT). Para absorción a través de superficies mucosas, las composiciones y los métodos para administrar por lo menos un anticuerpo anti-IL-12, incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas de tamaño submicrométrico, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo, y una fase continua

10 acuosa, que promueven la absorción a través de las superficies mucosas logrando la mucoadhesión de las partículas en emulsión (véase patente de E.U.A. No. 5,514,670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones de la presente invención, pueden incluir vías de administración córnea, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar,

15 estomáquica, 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 contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas u

20 oleosas de gotas nasales. Para administración bucal, los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (véase patente de E.U.A. No. 5,849,695).

162

### Formulaciones transdérmicas y su administración

Para administración transdérmica, el anticuerpo anti-IL-12 (por lo menos uno) es encapsulado en un dispositivo de suministro tal como un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartícula, microcápsula o microesferas (referidas en conjunto como micropartículas, a menos que se indique de otra manera). Se conocen muchos dispositivos adecuados, que incluyen micropartículas hechas de polímeros sintéticos tales como polihidroxiácidos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfazenos, y polímeros naturales tales como colágena, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y combinaciones de los mismos (véase patente de E.U.A. No. 5,814,599).

### Administración prolongada y formulaciones para la misma

Puede ser deseable a veces suministrar los compuestos de la presente invención al sujeto durante períodos prolongados, por ejemplo, durante períodos de una semana a un año a partir de una administración individual. Pueden usarse varias formas de dosificación de liberación lenta, depósito o implante. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los compuestos que tenga un bajo grado de solubilidad en fluidos corporales, por ejemplo, (a) una sal ácida de adición con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico,

163

ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácidos naftalen mono- o di-sulfónicos, ácido poligalacturónico, y similares; (b) una sal con un catión de metal 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, de preferencia, una sal relativamente insoluble tal como las descritas anteriormente, pueden formularse en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de ajonjolí, adecuado para inyección. Sales particularmente preferidas son sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato, y similares. Otro tipo de formulación repositaria de liberación lenta para inyección contendría el compuesto o la sal dispersada encapsulada 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 E.U.A. No. 3,773,919. Los compuestos o, de preferencia, sales relativamente insolubles tales como las descritas anteriormente, pueden formularse también en pellas silásticas de matriz de colesterol, en particular para su uso en animales. Otras formulaciones repositarias o implante de liberación lenta, por ejemplo, liposomas de gas o líquido, se conocen en la literatura (véase patente de E.U.A. No. 5,770,222

y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Habiendo descrito en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente con relación a los siguientes ejemplos, los cuales se proveen a manera de ilustración, y no se pretende que sean limitativos.

### **EJEMPLO 1**

#### **Clonación y expresión de anticuerpo de IL-12 en células de mamífero**

Un vector de expresión de mamífero típico contiene por lo menos un elemento promotor, el cual media el inicio de la transcripción de las secuencias codificantes del anticuerpo, regiones variables de cadena ligera y pesada codificantes adyacentes a secuencias codificantes de regiones constantes conocidas, y señales requeridas para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcrito. Otros elementos incluyen intensificadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para empalme de ARN. Puede lograrse transcripción altamente eficiente con los promotores temprano y tardío del SV40, las repeticiones terminales largas (LTRs) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, pueden usarse también elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano). Vectores de expresión adecuados para su uso

165

en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (37152 de ATCC), pSV2dhfr (37146 de ATCC) y pBC12MI (67109 de ATCC). Células hospederas de mamífero que podrían usarse incluyen células de Hela 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, células Cos 1, Cos 7 y CV 1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO). En forma alternativa, el gen puede expresarse en líneas de células estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina, permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado puede amplificarse también para expresar grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas de células que poseen varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy, *et al.*, Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington, *et al.*, Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). Mediante el uso de estos marcadores, las células de mamífero se desarrollan en medio selectivo, y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas de células contienen los genes amplificados integrados en un cromosoma. Células de ovario de hámster chino (CHO) y células NSO,

se usan con frecuencia para la producción de anticuerpos.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, *et al.*, Molec. Cell. Biol. 5: 438-447 (1985)) más un fragmento del intensificador del CMV (Boshart, *et al.*,  
 5 Cell 41: 521-530 (1985)). Sitios de clonación múltiples, por ejemplo, con los sitios de digestión por enzima de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el intrón 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de pre-proinsulina de rata.

#### 10 Clonación y expresión en células CHO

El vector pC4 se usa para la expresión del anticuerpo de IL-12. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (No. de acceso de ATCC 37146). El plásmido contiene el gen de DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano del SV40. Células de ovario de hámster chino u otras  
 15 células que carecen de actividad de dihidrofolato que son transfectadas con estos plásmidos, pueden seleccionarse desarrollando las células en un medio selectivo (por ejemplo, MEM alfa menos, Life Technologies, Gaithersburg, MD), complementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La  
 20 amplificación de los genes de DHFR en células resistentes a metotrexato (MTX), ha sido bien documentada (véase, 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 que crecen en concentraciones crecientes de MTX,

167

desarrollan resistencia al fármaco produciendo excesivamente la enzima objetivo, DHFR, como resultado de amplificación del gen de DHFR. Si un segundo gen es enlazado al gen de DHFR, es usualmente co-amplificado y sobreexpresado. Se sabe en la técnica que este procedimiento puede usarse  
5 para desarrollar líneas de células que poseen más de 1000 copias de los genes amplificados. Después, cuando el metotrexato es retirado, se obtienen líneas de células que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula hospedera.

Pueden usarse también promotores de alta eficiencia diferentes  
10 del promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous para la expresión, por ejemplo, el promotor de b-actina humana, los promotores temprano o tardío del SV40, o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV. Sistemas de expresión de genes Tet-Off y Tet-On de Clontech, y sistemas similares pueden usarse para  
15 expresar la IL-12 en una forma regulada en células de mamífero (M. Gossen y H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del ARN mensajero, pueden usarse también otras señales, por ejemplo, de los genes de globina u hormona de crecimiento humano. Líneas de células estables que poseen un gen de interés integrado en los  
20 cromosomas, pueden seleccionarse también tras co-transfección con un marcador seleccionable, tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso usar más de un marcador seleccionable al inicio, por ejemplo, G418 más metotrexato. El plásmido pC4 es digerido con enzimas de restricción, y

desfosforilado entonces usando fosfatasa intestinal de ternera, mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector es aislado entonces de un gel de agarosa a 1%.

Se usa la secuencia de ADN que codifica para el anticuerpo de IL-12 completo que corresponde a las regiones CDR HC y LC de un anticuerpo de IL-12 de la presente invención, respectivamente, de acuerdo a pasos de método conocidos. Acido nucleico aislado que codifica para una región constante humana adecuada (es decir, regiones HC y LC), se usa también en esta construcción.

El ADN aislado que codifica para la región constante y variable, y el vector desfosforilado, son ligados entonces con ADN ligasa T4. Se transforman entonces células HB101 o XL-1 Blue de *E. coli*, y se identifican bacterias que contengan el fragmento insertado en el plásmido pC4 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Para la transfección, se usan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen de DHFR activo. 5 µg del plásmido de expresión pC4 son co-transfectados con 0.5 µg del plásmido pSV2-neo usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica para una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos que incluyen G418. Las células se siembran en medio MEM alfa menos complementado con 1 µg/ml de G418. Después de 2 días, las células son tripsinizadas y sembradas en placas de clonación de hibridomas (Greiner, Alemania) en medio MEM alfa menos

complementado con 10, 25 ó 50 ng/ml de metotrexato más 1 µg/ml de G418. Después de aproximadamente 10 a 14 días, los clones individuales son tripsinizados y sembrados entonces en cajas de Petri de 6 cavidades o matraces de 10 ml usando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato, son transferidos entonces a nuevas placas de 6 cavidades que contienen concentraciones aún mayores de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtengan clones que crezcan a una concentración de 100-200 mM. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y Western blot, o mediante análisis de CLAR de fase invertida.

## **EJEMPLO 2**

### **Comparación de la eficacia terapéutica de anticuerpos anti-IL-12p35 y anti-IL-12/23p40 en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) de murino**

#### **Resumen**

Esta serie de estudios se llevó a cabo para investigar la eficacia terapéutica de IL-12 o la neutralización específica de IL-12/IL-23 en un modelo de ratón para esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Se administraron anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-ratón de rata

neutralizantes específicos para la subunidad p35 de IL-12 o la subunidad p40 que es compartida entre IL-12 e IL-23, antes de la inducción de enfermedad, antes del inicio de enfermedad, o después de que la enfermedad estaba en curso. En todos los casos, sólo anti-p40 demostró potencial terapéutico. Estos  
 5 datos sugieren que IL-23 es el contribuidor predominante a la patogénesis de enfermedad en este modelo autoinmune.

### Abreviaturas

|    |              |                                          |
|----|--------------|------------------------------------------|
|    | IL           | Interleucina                             |
| 10 | mAb          | Anticuerpo monoclonal                    |
|    | EAE          | Encefalomiелitis autoinmune experimental |
|    | Th           | Célula T auxiliar                        |
|    | IFN $\gamma$ | Interferón gamma                         |
|    | cs           | Puntuación clínica                       |
| 15 | MBP          | Proteína básica de mielina               |
|    | PK           | Farmacocinética                          |

### Introducción

La IL-12 biológicamente activa existe como un heterodímero que  
 20 comprende 2 subunidades enlazadas covalentemente de 35 (p35) y 40 (p40) kiloDaltons. Varias líneas de evidencia han demostrado que la IL-12 puede inducir respuestas inmunes Th1 vigorosas que se caracterizan por la producción de IFN $\gamma$  e IL-2 a partir de células T CD4<sup>+</sup>. Se cree que respuestas

Th1 inadecuadas, y de esta manera la expresión de IL-12, se correlacionan con muchas enfermedades mediadas por el sistema inmune, tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente y uveítis. En modelos animales, se

5   mostró que la neutralización de la IL-12 mejora la enfermedad mediada por el sistema inmune. Sin embargo, estos estudios neutralizaron la IL-12 a través de su subunidad p40. La descripción reciente de la IL-23 (1), una citocina heterodimérica que comparte la subunidad p40, hizo importante determinar si

10   los hallazgos previos se debieron a la actividad de la IL-12 o la IL-23. Por lo tanto, se comparó la neutralización específica de p35 y p40 en un modelo de autoinmunidad en ratones, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Anticuerpos neutralizantes específicos para IL-12p35 no tuvieron efecto alguno sobre la progresión de EAE. En contraste, la neutralización de la IL-12 y la IL-23 con un anticuerpo monoclonal anti-p40 suprimió los signos clínicos

15   de EAE, ya sea que el anticuerpo se administrara antes o después de la diferenciación de Th1. Estos datos sugieren que la actividad del tratamiento con anti-p40 en EAE se basa solamente en la neutralización de la IL-23.

### Métodos y materiales

20

#### Ratones

Se usaron ratones C3H/HEB/FEJ hembras (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en los análisis farmacocinéticos. Para estudios

172

de EAE, se adquirieron ratones B10.PL (H-2<sup>u</sup>) hembras de Jackson Laboratories, y se usaron cuando tenían entre 6 y 8 semanas de edad. Todos los animales se mantuvieron de acuerdo a las normas de IACUC bajo protocolos aprobados.

5

#### Anticuerpos

Se usaron hibridomas C17.8 (IL-12/IL-23p40 anti-ratón de rata, IgG2a) y C18.2 (IL-12p35 anti-ratón de rata, IgG2a), provistos por el Dr. Giorgio Trinchieri y el Wistar Institute (Filadelfia, PA). Se generó ascitis en  
10 Harlan Bioproducts (Indianapolis, IN), y se purificó por afinidad con proteína G.

#### PK del suero de anticuerpos anti-ratón de rata

Se pesaron individualmente ratones C3H/HEB/FEJ hembras, de aproximadamente 20 a 25 gramos, y se trataron con una dosis intraperitoneal  
15 individual de 5 mg/kg de anticuerpo marcado con <sup>125</sup>I (C17.8, C18.2), con un volumen de dosis constante/ratón de 10 mL/kg. Se tomaron sangrías retroorbitales de ratones anestesiados a 30 minutos, 6 y 24 horas y 4, 7, 11 y 18 días. Se dejó que las muestras de sangre reposaran a temperatura ambiente por cuando menos 30 minutos, pero no por más de 1 hora, y se  
20 centrifugaron entonces a aproximadamente 2,500-3,500 rpm por 10-15 minutos. Se contaron alícuotas de aproximadamente 50 µL de cada muestra de suero para <sup>125</sup>I usando un contador LKB Compugamma 1282 (Wallac, Gaithersburg, MD). Se contaron también alícuotas de 10 mL de los materiales

173

inyectados. La fracción promedio de los conteos inyectados en cada punto de tiempo se calculó y se multiplicó por el total de mg de anticuerpos inyectados para determinar el total de mg que quedaban en el suero en cada punto de tiempo. Los datos se muestran como los mg medios de anticuerpo monoclonal  
5 en los sueros +/- desviación estándar con 5 a 10 animales en cada grupo.

#### Inducción y puntuación de EAE

Para la inducción de EAE, se inyectó subcutáneamente a ratones B10.PL hembras en cuatro sitios sobre el dorso con un total de 100  $\mu$ l  
10 de CFA (conteniendo 200  $\mu$ g de la cepa Jamaica de *Mycobacterium tuberculosis*) combinados con 200  $\mu$ g de MBP de conejillos de Indias (Sigma). Los ratones recibieron también 200 ng de toxina de pertussis (List Biological, Campbell, CA) i.p. en 0.2 ml de PBS al momento de la inmunización, y 48 horas después. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de  
15 anticuerpos monoclonales C17.8 (anti-IL-12p40) o C18.2 (anti-IL-12p35) diluidos a 100 mg/kg (C18.2) o 20 mg/kg (C17.8) en PBS, en los días indicados. Ratones control recibieron PBS o IgG de rata (Biosource) a 20 mg/kg en PBS.

Los animales que demostraron signos clínicos (cs) fueron  
20 calificados como sigue: cola flácida o modo de andar con contoneo con tonicidad de la cola 1, modo de andar con contoneo con cola flácida (ataxia) 2, ataxia con parálisis parcial de la extremidad 2.5, parálisis completa de una extremidad 3, parálisis completa de una extremidad con parálisis parcial de

segunda extremidad 3.5, parálisis completa de dos extremidades 4, moribundo 4.5, muerto 5. Los animales que tuvieron una puntuación de 5 no se incluyeron en el análisis de cs diario medio para el resto del experimento. Los cs diarios se promedian para el grupo, y se describen incidencia media, día de inicio, cs agudos más altos, cs acumulativos, cs/día, número de 5 recidivas y severidad de las recidivas  $\pm$  sem (error estándar de la media). Se calcularon cs acumulativos medios por grupo, promediando la suma de puntuaciones clínicas diarias para cada uno de los animales. Se calcularon los cs/día dividiendo los cs acumulativos entre el número de días en que el animal 10 permaneció en el estudio. Para determinar el día medio de inicio, los animales que no estaban desarrollando EAE no se incluyeron en el análisis. Para determinar los cs medios más altos, a los ratones que no estaban desarrollando EAE se les asignó un valor de "0" y se incluyeron en el análisis. Las recidivas se definieron por una disminución de punto completo en 15 puntuación clínica sostenida por cuando menos 2 días observados seguida de un incremento de punto completo en puntuación clínica sostenida por cuando menos 2 días observados.

### Resultados y discusión

20

Los anticuerpos anti-p35 y anti-p40 tienen farmacocinética idéntica

Para establecer las velocidades de depuración de anticuerpos

175

anti-p40 y anti-p35, se inyectó a ratones normales con una dosis individual de 5 mg/kg de anticuerpos marcados con  $^{125}\text{I}$ , y se midieron los niveles circulantes por 11 días post-administración del anticuerpo. Anti-p35 y anti-p40 tuvieron farmacocinética traslapante, demostrando que las velocidades de depuración son idénticas en los ratones normales (2). La velocidad de depuración esperada de cada anticuerpo monoclonal es de aproximadamente 7 a 10 días. Aunque este es un estudio de PK de dosis individual, estos datos apoyan la dosificación de una vez por semana para estudios *in vivo*.

10                    Sólo el tratamiento con anti-p40 previo a la inducción de EAE, es protector

Para determinar las funciones relativas de la IL-12 y la IL-23 en enfermedades mediadas por el sistema inmune, se usó un modelo de murino para esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) recurrente. Tras la inducción de EAE con proteína básica de mielina (MBP) en adyuvante, los ratones B10.PL exhiben típicamente un episodio inicial de parálisis (enfermedad aguda), entonces se recuperan parcialmente o completamente, y progresan a través de recidivas múltiples y/o EAE crónica. Se ha asumido desde hace tiempo que la EAE depende de la expresión de la IL-12, ya que se cree que la IL-12 es un mediador primario de diferenciación de Th0 a Th1. Sin embargo, para distinguir la función potencial de la IL-23 en la inducción de EAE, se establecieron concentraciones neutralizantes de anticuerpos anti-p40 (IL-12 e IL-23) o anti-p35 (sólo IL-12) un día antes de la

inmunización para EAE (día 1). El inicio de la enfermedad puede variar entre los animales; por lo tanto, se repitió el tratamiento 7 y 14 días después para asegurar que los anticuerpos anti-p35 y anti-p40 estuvieran presentes durante la diferenciación de Th1. Varios estudios de neutralización *in vitro* han

5 demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-p40 es 5 veces más efectivo para neutralizar la IL-12 que el anticuerpo monoclonal anti-p35 (datos no mostrados). Por lo tanto, la dosis de anticuerpo monoclonal anti-p35 se ajustó para ser 5 veces mayor que anti-p40 en todos los experimentos de EAE. En dos experimentos separados, ratones tratados con anticuerpo control de

10 isotipos de IgG de rata (20 mg/kg) o anti-p35 (100 mg/kg), no demostraron protección ante la enfermedad. Es importante notar que la administración periférica de un anticuerpo control no específico (IgG de rata) no alteró el curso clínico de enfermedad cuando se comparó con ratones no tratados con EAE. En ambos estudios, ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-

15 p40 (20 mg/kg) exhibieron inhibición casi completa de signos clínicos de EAE. Remarcablemente, la supresión de la enfermedad se extendió más allá de la velocidad esperada de depuración del anticuerpo a través de 70 días post-inducción de EAE. En cada experimento, sólo un animal tratado con anti-p40 exhibió dos días consecutivos de signos clínicos de EAE, y cada uno

20 demostró un inicio tardío y puntuaciones clínicas agudas significativamente menores, puntuaciones clínicas acumulativas y ausencia de recidivas en la enfermedad (cuadro 1). Estos resultados demuestran que la neutralización de la IL-12 y la IL-23 a través de la subunidad p40 compartida, proveyó

protección casi completa ante la EAE. En contraste, la neutralización específica de la IL-12 sólo por medio de anti-p35, fue ineficaz. Estos datos sugieren fuertemente que la EAE no es mediada por la IL-12.

5                    Sólo el tratamiento con anti-p40 justo antes del inicio de la enfermedad, es protector

Aunque el tratamiento profiláctico protegió por completo a los ratones ante la EAE, quedó por determinar si la neutralización específica de la IL-12 sería protectora una vez que la población de Th1 fue establecida *in vivo*.

10    Por lo tanto, en una serie de experimentos separada, se trató a ratones con un anticuerpo control (IgG de rata), anti-p35 o anticuerpos monoclonales anti-p40 diez días después de la inducción de EAE, pero antes del inicio de la enfermedad. Puesto que ocurren respuestas inmunes típicas dentro de 7 días, este punto de tiempo debe reflejar los efectos de los anticuerpos

15    monoclonales anti-IL-12 o anti-IL-23 sobre las células Th1 diferenciadas. El inicio de la EAE puede variar entre los animales, y por lo tanto el tratamiento se repitió 7 y 14 días después para asegurar que los anticuerpos anti-p35 y anti-p40 estuvieran presentes durante el inicio de la enfermedad. En dos experimentos separados, ratones tratados con anticuerpo control de isotipos

20    (20 mg/kg) o anti-p35 (100 mg/kg) no fueron protegidos de la enfermedad, cuando se compararon con ratones no tratados con EAE. Sin embargo, los ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-p40 (20 mg/kg) fueron significativamente protegidos de la EAE. Como se muestra en los estudios

descritos previamente, se observó supresión de la enfermedad bien más allá del tiempo requerido para la depuración de anticuerpos administrados periféricamente a través del día 70 post-inducción de EAE. Considerando que el anticuerpo no se administró sino hasta después de la diferenciación de Th1  
5 (día 10), no fue sorprendente que la incidencia de enfermedad, día de inicio y la puntuación clínica más alta durante la EAE aguda, no fueran diferentes en los grupos (cuadro 2). Sin embargo, en ambos experimentos, los ratones que recibieron anti-p40 exhibieron puntuaciones clínicas acumulativas, puntuaciones clínicas por día y severidad de recidivas significativamente  
10 menores.

Sólo el tratamiento con anti-p40 durante la EAE establecida, es protector

El obstáculo más difícil, pero clínicamente relevante para  
15 cualquier terapia, es suprimir la enfermedad establecida. Por lo tanto, se llevó a cabo otra serie de experimentos en los cuales se inmunizó a ratones para EAE, y entonces se dividió a los ratones en grupos de tratamiento una vez que la enfermedad estaba en curso. Aproximadamente 30 días post-inducción de EAE, los ratones habían progresado a través de la fase aguda de la  
20 enfermedad. En este tiempo, se dividió a los animales en grupos con puntuaciones clínicas diarias y acumulativas comparables. El tratamiento se repitió 7 y 14 días después para asegurar que los anticuerpos estuvieran disponibles en concentraciones neutralizantes durante la transición de la

179

enfermedad de aguda a crónica o remitente-recurrente. Sólo el tratamiento con anti-p40 (20 mg/kg) mejoró la enfermedad cuando se comparó con animales tratados con anticuerpo control de isotipos (20 mg/kg) o anti-p35 (100 mg/kg). Se observó supresión de la enfermedad a través del día 80 post-inducción de EAE. En ambos experimentos, el análisis del primer día de tratamiento a través del día 80 demostró que los ratones que recibieron anti-p40 exhibieron puntuaciones clínicas acumulativas menores, puntuaciones clínicas por día y la última puntuación clínica más alta post-tratamiento. Estos datos sugieren que no sólo es probable que la IL-23 medie la diferenciación de Th1 (cuadro 1) y la inducción de EAE (cuadro 2), sino que la IL-23 contribuye también a la fase efectora de respuestas crónicas mediadas por el sistema inmune (por ejemplo, respuestas autoinmunes) (cuadro 3). Por lo tanto, el tratamiento con anti-p40 puede ofrecer terapia en cualquier momento en la progresión de enfermedades mediadas por el sistema inmune.

15

### Conclusiones

El entendimiento de la función de la IL-12 en la función inmune, se ha basado en estudios de la subunidad p40 de la IL-12. Por lo tanto, se llevó a cabo una comparación codo a codo de la neutralización de la subunidad p35 específica de la IL-12 contra la subunidad p40 compartida entre la IL-12 y la IL-13, en un modelo animal de enfermedad autoinmune. La neutralización por medio de anti-p40 inhibió significativamente la EAE cuando se administró anticuerpo monoclonal en cualquier punto de tiempo. Sin

180

embargo, la neutralización específica de la IL-12 fue completamente ineficaz. Por lo tanto, los datos muestran que la IL-12 no contribuye a este modelo autoinmune, y que se espera que la IL-23 sea el mediador más prominente de respuestas autoinmunes de células T.

5

### **EJEMPLO 3**

#### **Epítoto neutralizante de p40**

##### Resumen

10           Se determinó el epítoto para un anticuerpo neutralizante (anticuerpo monoclonal p40) contra la subunidad p40 de humano de la IL-12 y la IL-23, con base en la estructura cristalina del complejo Fab/IL-12. El epítoto se localiza en el dominio D1 (residuos 1-88) de la subunidad p40 de la IL-12 de humano. Esta región está distante de la interfaz p40/p35, y se espera que  
15       esté también disponible en la subunidad p40 de la IL-23. Los residuos implicados en la unión del anticuerpo al antígeno son discontinuos (cuadro 4), y comprenden un epítoto conformacional único. Anticuerpos contra este epítoto o porciones del mismo y regiones vecinas, llevarán al bloqueo de las funciones de la IL-12 y la IL-23 mediadas a través de esta parte de la  
20       subunidad p40.

##### Introducción

Se ha mostrado que un anticuerpo monoclonal completamente

humano (anticuerpo monoclonal p40) dirigido contra la IL-12 de humano, es un neutralizador potente de la función de la IL-12 y la IL-23. Se ha mostrado que el anticuerpo monoclonal p40 se une a la subunidad p40, y bloquea la unión de ambas citocinas a sus receptores. Debido a que la subunidad p40 es compartida entre la IL-12 y la IL-23, las interacciones detalladas entre la IL-12 y el anticuerpo monoclonal p40 definen un epítipo neutralizante común importante, el cual a su vez puede arrojar alguna luz sobre las interacciones entre la citocina y el receptor.

#### 10                    Determinación del epítipo con base en la estructura cristalina de Fab de p40/IL-12

El anticuerpo monoclonal p40 se produjo de una línea de células de mamífero en cultivo, y se purificó por medio de columna de proteína A. El anticuerpo monoclonal p40 (70 mg) fue digerido con papaína (0.25 unidades de papaína por miligramo de IgG) en regulador de pH de activación (fosfato de sodio a 0.03 M, NaCl a 0.15 M, EDTA a 0.01 M, L-cisteína a 0.0072 M, pH 7.0) a 37°C por 2 horas. Se monitoreó la digestión por espectrometría de masa de ionización-desorción láser de superficie mejorada (SELDI). Se usó yodoacetamida (0.5 M) para detener la digestión. Se removió Fc por medio de proteína G inmovilizada. El Fab de p40 fue purificado además por filtración en gel en una columna Superdex 200 16/60. Se obtuvo un total de 44 mg de Fab de p40 purificado, y su pureza se analizó por SDS-PAGE.

Se produjo IL-12 humana recombinante en cultivo a partir de una

182

línea de células transfectada establemente que sobreexpresa las subunidades p40 y p35, y se purificó con una columna de afinidad de anticuerpo monoclonal p40. Las fracciones de proteína se colectaron y se dializaron en Tris a 10 mM, NaCl a 100 mM, pH 7.4, y se concentraron hasta 2.5 mg/ml. La

5 IL-12 fue desglucosilada por incubación con varias combinaciones de enzimas de desglucosilación (PNGasa F, sialadasa, endo-O-glicosidasa,  $\alpha$ -,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -manosidasa, fucosidasa [aproximadamente 5mU-10U/100  $\mu$ g de proteína) por 3 días a 37°C bajo argón.

Se mezcló IL-12 desglucosilada con un exceso del Fab de p40.

10 El complejo IL-12/Fab de p40 se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en Tris a 10 mM, NaCl a 50 mM, pH 7.4. El complejo aislado se concentró hasta aproximadamente 4 mg/ml. El complejo IL-12/Fab de p40 se cristalizó usando el método de difusión de vapor de gota asentada combinando la solución del complejo de proteínas anterior a una relación en

15 volumen de 1:1 con una solución de depósito de Tris a 50 mM, pH 7.0, PEG 3350 a 16%. Cristales de forma cúbica, piramidal o de varilla de típicamente 50 a 150  $\mu$ m de tamaño, aparecen dentro de dos semanas a 16°C.

Los cristales se cosecharon y se sumergieron en la solución madre más etilenglicol a 30%, y se congelaron instantáneamente en nitrógeno

20 líquido para colecta de datos de rayos X. La mejor serie de datos se colectó (360 grados, 0.5 grados/estructura, exposición de 10 segundos por estructura) a un límite de difracción de 2.8 Å en Advanced Photon Source (APS), Argonne National Laboratory, (Axas-ComCat). Los datos de difracción se procesaron

con Denzo y ScalePack. (Otwinowski & Minor, *Methods Enzymol.* 276: 307-326). El grupo espacial para esta forma de cristal es  $P2_12_12_1$ , con dimensiones de célula de  $a=116.8 \text{ \AA}$ ,  $b=55.77 \text{ \AA}$ ,  $c=182.96 \text{ \AA}$  y  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Existen 27,141 reflexiones independientes, y los datos fueron aproximadamente 90%  
5 completos a  $3.0 \text{ \AA}$  ( $I/\Sigma = 5.2$ ,  $R_{\text{sim}}=9\%$ ).

La estructura cristalina se resolvió por reemplazo molecular implementado en CNX (Accelrys, CA). Los modelos de búsqueda fueron la estructura de IL-12 publicada (código 1F45 de PDB) para la IL-12, y un modelo de homología para Fab de p40 basado en una estructura cristalina de  
10 Fab (código 1VGE de PDB). Los modelos moleculares para la IL-12 y el fab de p40 se inspeccionaron visualmente, y se ajustaron manualmente usando XtalView. El refinamiento de estructura se llevó a cabo con CNX. Los modelos moleculares fueron validados con InsightII (Accelrys, CA). La estructura molecular del complejo unido de IL-12/Fab de p40 se muestra en la figura 1 en  
15 una representación de bandas.

El sitio de unión al anticuerpo monoclonal p40 (epítoto p40) en la superficie molecular en representaciones de superficie y de bandas, se muestra en la figura 2. Los residuos de unión del epítoto se definen como cualquier residuo de p40 de superficie expuesta (accesibilidad relativa del  
20 solvente de 0.1 o mayor) con cualquier átomo dentro de  $4 \text{ \AA}$  de cualquier átomo del anticuerpo, de acuerdo a una convención generalmente aceptada. Las accesibilidades de superficie fueron calculadas por ICM (Molsoft, CA), usando los parámetros predeterminados. Los residuos que comprenden el

epítope de unión al anticuerpo monoclonal p40 en p40 de la IL-12 se enlistan en el cuadro 4, junto con sus áreas de superficie expuestas (sf) y accesibilidades relativas (relación sf). (La definición de área de superficie expuesta de un residuo de aminoácido dentro del contexto de proteínas, ha sido bien aceptada en el campo. En particular, una molécula de agua con un radio de 1.4 Å se hace rodar a lo largo de la superficie de una proteína, y la cantidad de área obtenida por este cálculo para un residuo específico se asigna al área de superficie expuesta de ese residuo. El área de superficie total para un aminoácido en conformación completamente extendida, está también disponible. La accesibilidad de superficie (relación sf), es entonces la relación del área de superficie expuesta sobre el área de superficie estándar. Estos dos valores en conjunto dan ideas de si un residuo es expuesto sobre la superficie de una proteína. Apparently, sólo los residuos expuestos en la superficie pueden estar implicados en la unión a otras moléculas tales como un anticuerpo. Sin embargo, no se necesita explicar todo esto en el texto).

Es claro del cuadro 4 y la figura 2 (panel de la derecha) que el sitio de unión en p40 es discontinuo, y constituye un gran número de residuos de superficie expuestos que están distribuidos sobre una superficie irregular. La interacción anticuerpo-antígeno oculta un total de 1758 Å<sup>2</sup> de superficie accesible en la IL-2 y el anticuerpo monoclonal p40. Las interacciones parecen ser dominadas por tres puentes de sal: R59(H)-E59(p40), R98(H)-E45(p40) y R99(H)-D62(p40). Asimismo, existen contribuciones a la interacción anticuerpo-antígeno que se deben a fuerzas hidrofóbicas o de Van

der Waals.

Los residuos en el anticuerpo de IL-12p40 implicados en la unión a la IL-12 identificados con base en la estructura co-cristalina de la presente, se muestran en el cuadro 5 más adelante. Todos los residuos de superficie expuestos del anticuerpo anti-p40 con cualquier átomo dentro de 4Å de la subunidad p40, se consideran como parte de estos residuos de unión. Cambios conservativos a cualquiera de uno o más de estos residuos pueden producir anticuerpos mutantes que son de potencia similar. Ejemplos de dichas sustituciones conservativas incluyen, sin limitación, R59K, R98K y R99K en VH (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) y DIE en VL (por ejemplo, SEQ ID NO: 8).

Asimismo, puede llevarse a cabo mutagénesis de saturación en cada posición mostrada en el cuadro 5 (por ejemplo, cambiando la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (WT) por cualquier otro aminoácido, posiblemente salvo la cisteína), para identificar mutaciones que hacen que el anticuerpo resultante tenga actividad incrementada, disminuida o sustancialmente similar (por ejemplo, unión). La unión del anticuerpo resultante a la subunidad p40 puede ponerse a prueba de acuerdo con cualquier prueba de unión adecuada. Puede usarse mutagénesis de saturación, por ejemplo, para crear un anticuerpo más o menos potente o un anticuerpo igualmente potente que tenga propiedades diferentes, es decir, propiedades diferentes de la potencia que resulta de un cambio en la secuencia de la región variable (por ejemplo, tamaño u otros cambios

estructurales a la región variable).

La mutagénesis de saturación puede llevarse a cabo también usando más de una sustitución, por ejemplo, dos, tres, o más posiciones para cada experimento. Esto puede hacerse como clones o colecciones  
5 individuales, seguido de selección o análisis en un formato adecuado, tal como exhibición de fagos. Además, mutaciones individuales o de combinación en las posiciones en el cuadro 5 que son deseables para regular la actividad, pueden combinarse para crear mutantes de combinación adicionales de potencia similar o mejor.

10

#### Ventaja

El sitio de unión al anticuerpo monoclonal p40 está distante del sitio de asociación de p40/p35 (figura 1). La subunidad p19 de la IL-23 está relacionada evolutivamente con p35 de la IL-12 con homología de secuencia  
15 significativa. Es probable que p19 se asocie con p40 en una forma similar a p35. Por lo tanto, la región de unión al anticuerpo monoclonal p40 está también distante de la interacción p40/p19 en la IL-23. El epítipo identificado en la presente invención está igualmente disponible en la IL-12 y la IL-23; por consiguiente, no es sorprendente que el anticuerpo monoclonal p40 pueda  
20 bloquear activamente las funciones de ambas citocinas.

La IL-12 (p40/p35) y la IL-23 (p40/p19) interactúan con sus receptores respectivos (IL-12R $\beta$ 1/ $\beta$ 2 e IL-12R $\beta$ 1/IL-23R) en una forma similar. Inducen cascadas de señalización similares. Sin embargo, los detalles de las

187

interacciones citocina-receptor, no están claramente definidas al nivel molecular. El epítipo del anticuerpo monoclonal p40 recién definido podría representar un sitio biológicamente importante para las interacciones entre la familia de citocinas de la IL-12 con su receptor compartido, IL-12R $\beta$ 1. Por lo tanto, el epítipo es un objetivo importante para la intervención terapéutica que usa anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas recombinantes, pequeñas moléculas y otros agentes naturales o sintéticos.

#### **EJEMPLO 4**

##### **10 Mapeo del epítipo del anticuerpo monoclonal p40 en IL-12p40 usando análisis mutacional**

###### **Resumen**

Se llevó a cabo unión de mutantes de IL-12p40 con anticuerpo monoclonal p40 por medio de ELISA, para verificar el epítipo de unión. Con base en la estructura cristalina del complejo Fab de p40/IL-12, se generaron 7 mutantes individuales y 2 mutantes dobles. Los residuos mutados se localizan en la región de contacto de Fab de p40 en el dominio (D1) de la subunidad p40. La afinidad de unión relativa mostró que tres residuos cargados negativamente, E45, E59 y D62, contribuyen significativamente a las interacciones de unión con el anticuerpo monoclonal p40. Los otros residuos, M23, L40 y S43, tienen menos contribución pero apreciable. Este análisis mutacional confirma que el anticuerpo monoclonal p40 reconoce el dominio I

de la subunidad p40, y los residuos E45, E59, D62, M23, L40 y S43 forman parte del epítipo de unión.

### Materiales y métodos

5                   Siete mutantes individuales de p40 humanos, M23T, L40T, S43R, E45A, E45R, E59R y D62R, y dos mutantes dobles, S43R/E45A y S43R/E45R, se usan en los estudios. El p40 humano de tipo silvestre, hu-p40 WT, se usó como el control. Los mutantes de p40 fueron expresados transitoriamente en células HEK293E. Los sobrenadantes se usaron para las  
10   pruebas de unión.

En resumen, se revistieron placas de MSD de alta unión (Meso Scale Discovery, MD) con 5 µl de un anticuerpo monoclonal de captura (5 µg/ml) a temperatura ambiente por 1 hora. El anticuerpo monoclonal de captura reconoce la subunidad p40, pero no compite con el anticuerpo  
15   monoclonal p40. Ciento cincuenta (150) µl de regulador de pH bloqueador A de MSD a 5% se añadieron a cada cavidad, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con regulador de pH HEPES a 0.1 M (pH 7.4). Estas placas de ELISA cargadas de proteína se incubaron con 25 µl de diferentes sobrenadantes de mutante p40 expresados  
20   transitoriamente (dilución 1:10 con regulador de pH HEPES a 0.1 M, pH 7.4) por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con regulador de pH HEPES a 0.1 M (pH 7.4). Se dispensaron en las microcavidades veinticinco (25) µl de diferentes concentraciones de

anticuerpo monoclonal p40 marcado con Sulfo-TAG de MSD, variando de 0 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Después de incubación por 2 horas con agitación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con regulador de pH HEPES a 0.1 M (pH 7.4). Se dispensaron en cada cavidad ciento cincuenta (150)  $\mu\text{l}$  de regulador de pH T Read diluido de MSD, y las placas se analizaron con un aparato de formación de imágenes SECTOR (MSD).

### Resultados

Como se muestra en la figura 3, cada uno de E45R, E59R y D62R redujo significativamente la afinidad de unión de la muteína de p40 al anticuerpo monoclonal p40, en comparación con el p40 de tipo silvestre. E45A tuvo un efecto significativo pero menos dramático sobre la unión en comparación con E45R. Cada uno de M23T, L40T y S43R tuvo efecto moderado tras la unión.

La afinidad de unión relativa del anticuerpo monoclonal p40 a diferentes proteínas mutantes, se analizó además por medio de una prueba de captura. Como se muestra en la figura 4, cada uno de E54R, E59R y D62R suprimió casi por completo la unión al antígeno. Las otras mutaciones, M23T, L40T y S43R, en la interfaz, redujeron la unión en aproximadamente 40%. E45A redujo la unión en aproximadamente 70%.

Será claro que la invención puede ponerse en práctica de otra manera que como se describe particularmente en la descripción y los ejemplos anteriores. Numerosas modificaciones y variaciones de la presente

invención son posibles a la luz de las enseñanzas anteriores y, por lo tanto, están dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

**CUADRO 1****Puntuaciones clínicas de EAE con neutralización de la IL-12 y la IL-23 iniciada en el día -1 (antes de la****diferenciación de Th1)**

|    | Grupo           | Incidencia | Mortalidad | Día de inicio | Cs <sup>a</sup> aguda más alta | Cs <sup>b</sup> acumulativa | Cs/día  | Número de recidivas | Severidad de la recidiva |
|----|-----------------|------------|------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------|---------|---------------------|--------------------------|
| 5  | P-2001-060      |            |            |               |                                |                             |         |                     |                          |
|    | IgG de rata     | 13/13      | 4/13       | 30.5±3.2      | 3.6±0.3                        | 71.4±14.1                   | 1.2±0.2 | 1.3±0.2             | 3.6±0.2                  |
|    | Anti-p35        | 11/13      | 8/13       | 29.6±3.4      | 3.5±0.5                        | 45.5±11.5                   | 0.8±0.2 | 1.2±0.1             | 4.0±0.3                  |
|    | Anti-p40        | 1/13       | 0/13       | 40.0          | 0.1                            | 1.2±0.5                     | 0.0±0.0 | 0.0±0.0             | 0.0±0.0                  |
|    | P-2001-079      |            |            |               |                                |                             |         |                     |                          |
|    | Sin tratamiento | 6/7        | 0/7        | 24.7±2.7      | 3.2±0.6                        | 110.4±20.4                  | 1.7±0.3 | 1.0±0.4             | 3.8±0.1                  |
| 10 | IgG de rata     | 9/9        | 2/9        | 29.1±2.9      | 3.8±0.2                        | 90.6±10.1                   | 1.5±0.1 | 0.3±0.2             | 4.7±0.3                  |
|    | Anti-p35        | 10/10      | 1/10       | 30.0±2.6      | 3.9±0.2                        | 94.9±17.8                   | 1.4±0.2 | 0.7±0.3             | 3.9±0.2                  |
|    | Anti-p40        | 1/10       | 0/10       | 61.0          | 0.3                            | 1.6±1.1                     | 0.0±0.0 | 0.0±0.0             | 0.0±0.0                  |

<sup>a</sup> Puntuación clínica (cs)<sup>b</sup> cs acumulativa

Los ratones se trataron como se describió, y las puntuaciones clínicas se analizaron del día 0 a 70 días post-inducción de EAE. Los datos se muestran como la media por grupo ± s.e.m.

## CUADRO 2

**Puntuaciones clínicas de EAE con neutralización de la IL-12 y la IL-23 iniciada en el día 10 (después de la**

### **diferenciación de Th1)**

| 5  | Grupo           | Incidencia | Mortalidad | Día de inicio | Cs <sup>a</sup><br>aguda<br>más alta | Cs <sup>b</sup><br>acumulativa | Cs/día  | Número<br>de<br>recidivas | Severidad<br>de la<br>recidiva |
|----|-----------------|------------|------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------|---------|---------------------------|--------------------------------|
|    | P-2001-037      |            |            |               |                                      |                                |         |                           |                                |
|    | Sin tratamiento | 7/8        | 0/8        | 30.6±2.7      | 3.2±0.5                              | 51.5±14.4                      | 0.8±0.2 | 0.3±0.2                   | 3.3±0.8                        |
|    | IgG de rata     | 9/10       | 0/10       | 25.9±2.7      | 2.7±0.5                              | 74.7±15.8                      | 1.2±0.2 | 0.6±0.2                   | 3.7±0.4                        |
|    | Anti-p35        | 9/10       | 0/10       | 25.8±2.6      | 2.5±0.4                              | 58.8±15.6                      | 1.0±0.2 | 0.7±0.3                   | 3.2±0.3                        |
|    | Anti-p40        | 6/7        | 0/7        | 34.7±6.3      | 1.6±0.5                              | 14.9±7.5                       | 0.2±0.1 | 0.3±0.2                   | 1.5±0.5                        |
|    | P-2001-053      |            |            |               |                                      |                                |         |                           |                                |
| 10 | Sin tratamiento | 8/9        | 2/9        | 15.8±2.2      | 2.1±0.6                              | 56.4±19.1                      | 0.9±0.3 | 0.6±0.3                   | 3.3±0.5                        |
|    | IgG de rata     | 9/10       | 4/10       | 20.0±2.5      | 3.8±0.5                              | 70.1±17.7                      | 1.3±0.2 | 0.3±0.2                   | 4.2±0.4                        |
|    | Anti-p35        | 10/10      | 1/10       | 16.5±1.1      | 3.2±0.3                              | 93.8±15.7                      | 1.4±0.2 | 0.8±0.2                   | 3.2±0.3                        |
|    | Anti-p40        | 10/10      | 2/10       | 13.6±1.1      | 2.7±0.5                              | 23.2±7.9                       | 0.4±0.1 | 0.4±0.3                   | 2.0±0.4                        |

<sup>a</sup> Puntuación clínica (cs)

<sup>b</sup> cs acumulativa

Los ratones se trataron en los días 10, 17 y 24, y las puntuaciones clínicas se analizaron del día 0 a 70 días post-inducción de EAE. Los datos se muestran como la media por grupo ± s.e.m.

**CUADRO 3****Puntuaciones clínicas de EAE con neutralización de la IL-12 y la IL-23 iniciada en el día 30 (durante la EAE)****establecida)****Del primer tratamiento a 80 días post-inducción de EAE**

5

| Grupo              | Pre -TX <sup>a</sup> | Mortalidad | Cs <sup>b</sup><br>acumulativa | Cs/día  | Cs más<br>alta | Cs más<br>baja | Número<br>de<br>recidivas | Severidad<br>de la<br>recidiva |
|--------------------|----------------------|------------|--------------------------------|---------|----------------|----------------|---------------------------|--------------------------------|
| P-2002-01          |                      |            |                                |         |                |                |                           |                                |
| Sin<br>tratamiento | 2.7±0.6              | 1/5        | 132.9±29.3                     | 3.3±0.3 | 4.1±0.2        | 2.4±0.5        | 0.6±0.4                   | 3.7±0.0                        |
| Anti-p35           | 2.3±0.7              | 1/5        | 135.9±16.5                     | 2.7±0.3 | 3.8±0.4        | 1.8±0.3        | 2.0±0.4                   | 3.7±0.3                        |
| Anti-p40           | 2.0±0.2              | 1/6        | 75.6±16.1                      | 1.9±0.3 | 2.8±0.5        | 1.0±0.4        | 0.7±0.3                   | 2.5±1.0                        |
| P-2002-093         |                      |            |                                |         |                |                |                           |                                |
| IgG de rata        | 1.7±0.8              | 1/5        | 87.7±16.4                      | 2.1±0.2 | 3.7±0.4        | 1.2±0.5        | 1.5±0.5                   | 3.8±1.0                        |
| Anti-p35           | 1.9±0.7              | 1/5        | 98.2±9.7                       | 2.2±0.1 | 3.7±0.4        | 1.4±0.4        | 1.5±0.3                   | 3.3±0.2                        |
| Anti-p40           | 2.4±0.8              | 0/5        | 71.7±21.6                      | 1.5±0.4 | 2.9±0.6        | 0.8±0.5        | 1.3±0.3                   | 2.7±0.6                        |

<sup>a</sup> Puntuación clínica media por grupo en el primer día de tratamiento (Tx)<sup>b</sup> Puntuación clínica (cs)

10

194

**CUADRO 4****Residuos que contribuyen a la unión del epítipo del anticuerpo****monoclonal p40 en IL-12/p40**

|    | Número | Residuo | Sf    | Relación sf |
|----|--------|---------|-------|-------------|
| 5  | 15     | Trp     | 94.2  | 0.36        |
|    | 17     | Pro     | 69.3  | 0.46        |
|    | 18     | Asp     | 132.9 | 0.86        |
|    | 19     | Ala     | 27.7  | 0.22        |
|    | 20     | Pro     | 131.5 | 0.88        |
| 10 | 21     | Gly     | 18.7  | 0.21        |
|    | 23     | Met     | 142.4 | 0.66        |
|    | 40     | Leu     | 32.7  | 0.16        |
|    | 41     | Asp     | 69    | 0.45        |
|    | 42     | Gln     | 145.8 | 0.77        |
|    | 43     | Ser     | 58.2  | 0.46        |
|    | 45     | Glu     | 139.2 | 0.74        |
|    | 46     | Val     | 95.8  | 0.57        |
|    | 47     | Leu     | 95    | 0.48        |
|    | 54     | Thr     | 77.2  | 0.51        |
| 15 | 55     | Ile     | 32.7  | 0.17        |
|    | 56     | Gln     | 111   | 0.58        |
|    | 58     | Lys     | 69.2  | 0.32        |
|    | 59     | Glu     | 83.2  | 0.44        |
|    | 60     | Phe     | 113.3 | 0.51        |
|    | 61     | Gly     | 68.2  | 0.77        |
|    | 62     | Asp     | 41.3  | 0.27        |

195

**CUADRO 5**

**Residuos en el anticuerpo monoclonal p40 implicados en la unión al  
epítoto de IL-12/p40**

5

10

| Residuos de la cadena pesada | Residuos de la cadena ligera |
|------------------------------|------------------------------|
| S28                          | D1                           |
| T31                          | S30                          |
| Y32                          | W32                          |
| W33                          | Y49                          |
| D57                          | S56                          |
| R59                          | N92                          |
| R98                          | I93                          |
| R99                          | Y94                          |
| R100                         |                              |
| P101                         |                              |
| G102                         |                              |
| Q103                         |                              |

**NOVEDAD DE LA INVENCION****REIVINDICACIONES**

- 5                    1.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos 1 a 88 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
- 10                   2.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
- 15                   3.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 23, 40, 43, 45, 59 y 62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
- 20                   4.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 45, 59 y 62 de la

197

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

5        5.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a la IL-12 con una afinidad de por lo menos una seleccionada de por lo menos  $10^{-9}$  M, por lo menos  $10^{-10}$  M, por lo menos  $10^{-11}$  M o por lo menos  $10^{-12}$  M.

6.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho anticuerpo neutraliza sustancialmente por lo menos una actividad de por lo menos una proteína de IL-12.

10       7.- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para cualquiera de los anticuerpos anti-IL-12 aislados de mamífero de conformidad con las reivindicaciones 1 a 4.

8.- Un vector de ácido nucleico aislado que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 7.

15       9.- Una célula hospedera procariótica o eucariótica aislada que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 8.

20       10.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada además porque dicha célula hospedera es por lo menos una célula seleccionada de las células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma o linfoma, o cualquier derivado, célula transformada o inmortalizada de la misma.

11.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12, que comprende traducir la molécula de ácido nucleico de conformidad con la

198

reivindicación 7 bajo condiciones *in vitro*, de modo que el anticuerpo de IL-12 sea expresado en cantidades detectables o recuperables.

12.- Una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y por lo menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13.- La composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada además porque comprende por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

14.- Un anticuerpo o fragmento antiidiotípico que une específicamente un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15.- Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende

poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con, o a, dicha célula, tejido, órgano o animal.

5                   16.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque dicha cantidad efectiva es 0.001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal.

                  17.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque dicha puesta en contacto o dicha administración  
10 es por cuando menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal,  
15 intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

                  18.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque comprende administrar antes de,  
20 concurrentemente con, o después de, dicha puesta en contacto o administración, por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un

200

antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

10                    19.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es psoriasis.

                      20.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es  
15                    esclerosis múltiple.

                      21.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque dicha condición relacionada con anti-IL-12 es enfermedad de Crohn.

                      22.- Un dispositivo médico, que comprende un anticuerpo anti-IL-  
20                    12 aislado de mamífero de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar dicho anticuerpo anti-IL-12 por cuando menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso,

201

intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, 5 intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

23.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a una porción 10 de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, que comprende proveer una célula hospedera o animal no humano 15 transgénico o célula vegetal o planta transgénica capaz de expresar, en cantidades recuperables, dicho anticuerpo.

24.- Un anticuerpo anti-IL-12 producido por medio del método de conformidad con la reivindicación 23.

25.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que 20 comprende por lo menos una de (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une

202

a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

5                   26.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a la IL-12 con una afinidad de por lo menos una seleccionada de por lo menos  $10^{-9}$  M, por lo menos  $10^{-10}$  M, por lo menos  $10^{-11}$  M o por lo menos  $10^{-12}$  M.

                  27.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación  
10 26, caracterizado además porque dicho anticuerpo neutraliza sustancialmente por lo menos una actividad de por lo menos una proteína de IL-12.

                  28.- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos una de (i) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de  
15 SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de  
20 SEQ ID NO: 9.

                  29.- Un vector de ácido nucleico aislado que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 28.

                  30.- Una célula hospedera procariótica o eucariótica aislada que

203

comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 28.

31.- La célula hospedera aislada de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada además porque dicha célula hospedera es por lo menos una célula seleccionada de las células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma o linfoma, o cualquier derivado, célula transformada o inmortalizada de la misma.

32.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12, que comprende traducir la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 28 bajo condiciones *in vitro*, de modo que el anticuerpo de IL-12 sea expresado en cantidades detectables o recuperables.

33.- Una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una de (i) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y por lo menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

34.- La composición de conformidad con la reivindicación 33, caracterizada además porque comprende por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína

seleccionado de por lo menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

35.- Un anticuerpo o fragmento antiidiotípico que une específicamente un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una de (i) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

36.- Un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene

205

por lo menos una de (i) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que  
 5 corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 con, o a, dicha célula, tejido, órgano o animal.

37.- El método de conformidad con la reivindicación 36,  
 10 caracterizado además porque dicha cantidad efectiva es 0.001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal.

38.- El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque dicha puesta en contacto o dicha administración es por cuando menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo,  
 15 intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal,  
 20 intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

39.- El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque comprende administrar antes de,

concurrentemente con, o después de, dicha puesta en contacto o administración, por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un  
5 antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un  
10 inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

40.- El método de conformidad con la reivindicación 36,  
15 caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es psoriasis.

41.- El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es esclerosis múltiple.

20 42.- El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque dicha condición relacionada con anti-IL-12 es enfermedad de Crohn.

43.- Un dispositivo médico, que comprende un anticuerpo anti-IL-

207

12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una de (i) todas las  
secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2  
y 3; y (ii) todas las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de  
SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la  
5 proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido  
seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-  
47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en  
donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar  
dicho anticuerpo anti-IL-12 por cuando menos un modo seleccionado de  
10 parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular,  
intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario,  
intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical,  
intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico,  
intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar,  
15 intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico,  
intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal  
y transdérmico.

44.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12 aislado de  
mamífero que tiene por lo menos una de (i) todas las secuencias de  
20 aminoácidos de CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; y (ii) todas  
las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4,  
5 y 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12  
que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del

208

grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, que comprende proveer una célula hospedera o animal no humano transgénico o célula vegetal o planta transgénica capaz de expresar, en cantidades recuperables, dicho anticuerpo.

45.- Un anticuerpo anti-IL-12 producido por medio del método de conformidad con la reivindicación 44.

46.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que comprende por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

47.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque dicho anticuerpo se une a la IL-12 con una afinidad de por lo menos una seleccionada de por lo menos  $10^{-9}$  M, por lo menos  $10^{-10}$  M, por lo menos  $10^{-11}$  M o por lo menos  $10^{-12}$  M.

48.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque dicho anticuerpo neutraliza sustancialmente por lo menos una actividad de por lo menos una proteína de IL-12.

49.- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para por lo menos un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo

menos dos CDRs de cadena pesada o de cadena ligera que tienen la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

50.- Un vector de ácido nucleico aislado que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 49.

51.- Una célula hospedera procariótica o eucariótica aislada que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 49.

52.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 50, caracterizada además porque dicha célula hospedera es por lo menos una célula seleccionada de las células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma o linfoma, o cualquier derivado, célula transformada o inmortalizada de la misma.

53.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12, que comprende traducir la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49 bajo condiciones *in vitro*, de modo que el anticuerpo de IL-12 sea expresado en cantidades detectables o recuperables.

54.- Una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos

una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y por lo menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55.- La composición de conformidad con la reivindicación 54, caracterizada además porque comprende por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esterooidal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

56.- Un anticuerpo o fragmento antiidiotípico que une específicamente un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12

que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

57.- Un método para diagnosticar o tratar una condición  
 5 relacionada con IL-12 en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4,  
 10 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, con, o a, dicha célula, tejido, órgano o animal.

15 58.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque dicha cantidad efectiva es 0.001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal.

59.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque dicha puesta en contacto o dicha administración  
 20 es por cuando menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático,

212

intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

5                   60.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque comprende administrar antes de, concurrentemente con, o después de, dicha puesta en contacto o administración, por lo menos una composición que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto o proteína seleccionado de por lo  
10 menos uno de un marcador o reportero detectable, un antagonista de FNT, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideal (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico,  
15 una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, una citocina y un antagonista de citocina.

20                   61.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es psoriasis.

62.- El método de conformidad con la reivindicación 57,

caracterizado además porque dicha condición relacionada con IL-12 es esclerosis múltiple.

63.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque dicha condición relacionada con anti-IL-12 es  
5 enfermedad de Crohn.

64.- Un dispositivo médico, que comprende un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que tiene por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una  
10 porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar dicho anticuerpo anti-IL-12 por cuando menos un modo  
15 seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelíaco, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático,  
20 intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, por bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

65.- Un método para producir un anticuerpo anti-IL-12 aislado de

214

mamífero que tiene por lo menos una CDR de cadena pesada o CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en donde dicho anticuerpo se une a una porción de la proteína de IL-12 que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, que comprende proveer una célula hospedera o animal no humano transgénico o célula vegetal o planta transgénica capaz de expresar, en cantidades recuperables, dicho anticuerpo.

10                    66.- Un anticuerpo anti-IL-12 producido por medio del método de conformidad con la reivindicación 65.

                    67.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a un epítipo en la subunidad p40 de la IL-12, que comprende el residuo de aminoácido glutamato en la posición 45, el residuo de aminoácido glutamato en la posición 59, el residuo de aminoácido aspartato en la posición 62, el residuo de aminoácido metionina en la posición 23, el residuo de aminoácido leucina en la posición 40 y el residuo de aminoácido serina en la posición 43.

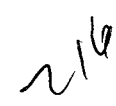
20                    68.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de

215

aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, en donde cualquiera de los residuos de la región variable diferente de los residuos de aminoácido 28, 31, 32, 33, 57, 59, 98, 99, 100, 101, 102 y 103 de SEQ ID NO: 7 y los residuos de aminoácido 1, 30, 32, 49, 56, 92, 93 y 94 de  
5 SEQ ID NO: 8, puede ser sustituido con un aminoácido diferente.

69.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde los residuos de dicho anticuerpo que interactúan con una porción de la proteína de IL-12 que comprende por lo menos uno de los  
10 residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, comprenden por lo menos uno de los residuos de aminoácido 28, 31, 32, 33, 57, 59, 98, 99, 100, 101, 102 y 103 de SEQ ID NO: 7 y los residuos de aminoácido 1, 30, 32, 49, 56, 92, 93 y 94 de SEQ ID NO: 8, o sustituciones conservativas de uno o más de dichos residuos de  
15 aminoácido de SEQ ID NO: 7 y 8.

70.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de  
20 aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, en donde uno o más de los residuos de la región variable de los residuos de aminoácido 28, 31, 32, 33, 57, 59, 98, 99, 100, 101, 102 y 103 de SEQ ID NO: 7 y los residuos de aminoácido 1, 30, 32, 49, 56, 92, 93 y 94 de SEQ ID NO: 8



sufren una sustitución conservativa.

71.- El anticuerpo anti-IL-12 de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado además porque la sustitución conservativa comprende uno o más de R59K de SEQ ID NO: 7, R98K de SEQ ID NO: 7, R99K de SEQ ID NO: 7 y D1E de SEQ ID NO: 8.

72.- Un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero, que comprende por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo se une a una porción del monómero de la proteína p40 o una subunidad de p40 en una proteína heterodimérica u homodimérica que corresponde a por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de los residuos 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 y 58-62 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

73.- Un método para alterar la actividad de un anticuerpo anti-IL-12 aislado de mamífero que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, que comprende sustituir uno o más residuos de la región variable de los residuos de aminoácido 28, 31, 32, 33, 57, 59, 98, 99, 100, 101, 102 y 103 de SEQ ID NO: 7 y los residuos de aminoácido 1, 30, 32, 49, 56, 92, 93 y 94 de SEQ ID NO: 8, por un residuo de aminoácido diferente.

74.- El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado además porque comprende el paso de poner a prueba la actividad del anticuerpo que tiene las secuencias de la región variable de

217

cadena ligera y de cadena pesada resultantes.

75.- Un anticuerpo producido por medio del método de conformidad con la reivindicación 73.

76.- Un anticuerpo aislado que comprende por lo menos dos  
5 regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en donde dicho anticuerpo compite por la unión con cualquiera de los anticuerpos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 4.

77.- Cualquier invención descrita en la presente.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centocor, Inc.

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-IL-12, Y EPITOPES, COMPOSICIONES, METODOS DE  
OBTENCION Y USOS DE LOS MISMOS

<130> CEN5087 PCT

10 <140> PCT/US2005/046063  
<141> 2005-12-20

<150> 60/637,819  
<151> 2004-12-21

15 <160> 9

<170> PatentIn Ver 3.1

20 <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1

25 Thr Tyr Trp Leu Gly  
1 5

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

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

40 <210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 3

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

50 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4

55

219

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 5 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 10 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 20 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 30 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 35 Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45  
 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  
 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 8  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

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  
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 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  
 20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr  
 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  
 <400> 9  
 30 Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu  
 1 5 10 15  
 35 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  
 40 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  
 45 Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe  
 85 90 95  
 50 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  
 55 Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu  
 130 135 140

22

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Met | Gln | Ala | Leu | Asn | Phe | Asn | Ser | Glu | Thr | Val | Pro | Gln | Lys | Ser | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 5  | 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 |     |
| 10 | Tyr | Leu | Asn | Ala | Ser | Ile | Trp | Glu | Leu | Lys | Lys | Asp | Val | Tyr | Val | Val | 195 | 200 | 205 |     |
| 15 | Glu | Leu | Asp | Trp | Tyr | Pro | Asp | Ala | Pro | Gly | Glu | Met | Val | Val | Leu | Thr | 210 | 215 | 220 |     |
|    | Cys | Asp | Thr | Pro | Glu | Glu | Asp | Gly | Ile | Thr | Trp | Thr | Leu | Asp | Gln | Ser | 225 | 230 | 235 | 240 |
| 20 | Ser | Glu | Val | Leu | Gly | Ser | Gly | Lys | Thr | Leu | Thr | Ile | Gln | Val | Lys | Glu | 245 | 250 | 255 |     |
| 25 | Phe | Gly | Asp | Ala | Gly | Gln | Tyr | Thr | Cys | His | Lys | Gly | Gly | Glu | Val | Leu | 260 | 265 | 270 |     |
|    | Ser | His | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | His | Lys | Lys | Glu | Asp | Gly | Ile | Trp | Ser | 275 | 280 | 285 |     |
| 30 | 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 |
| 35 | Thr | Thr | Ile | Ser | Thr | Asp | Leu | Thr | Phe | Ser | Val | Lys | Ser | Ser | Arg | Gly | 325 | 330 | 335 |     |
| 40 | 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 |     |
| 45 | 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 |
| 50 | Ser | Phe | Phe | Ile | Arg | Asp | Ile | Ile | Lys | Pro | Asp | Pro | Pro | Lys | Asn | Leu | 405 | 410 | 415 |     |
| 55 | Gln | Leu | Lys | Pro | Leu | Lys | Asn | Ser | Arg | Gln | Val | Glu | Val | Ser | Trp | Glu | 420 | 425 | 430 |     |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Tyr | Pro | Asp | Thr | Trp | Ser | Thr | Pro | His | Ser | Tyr | Phe | Ser | Leu | Thr | Phe |
|    |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| 5  | 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 |
| 10 | Ile | Ser | Val | Arg | Ala | Gln | Asp | Arg | Tyr | Tyr | Ser | Ser | Ser | Trp | Ser | Glu |
|    |     |     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
|    | Trp | Ala | Ser | Val | Pro | Cys | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 15 |     |     |     |     |     | 500 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

20

25

5

223



FIG. 1

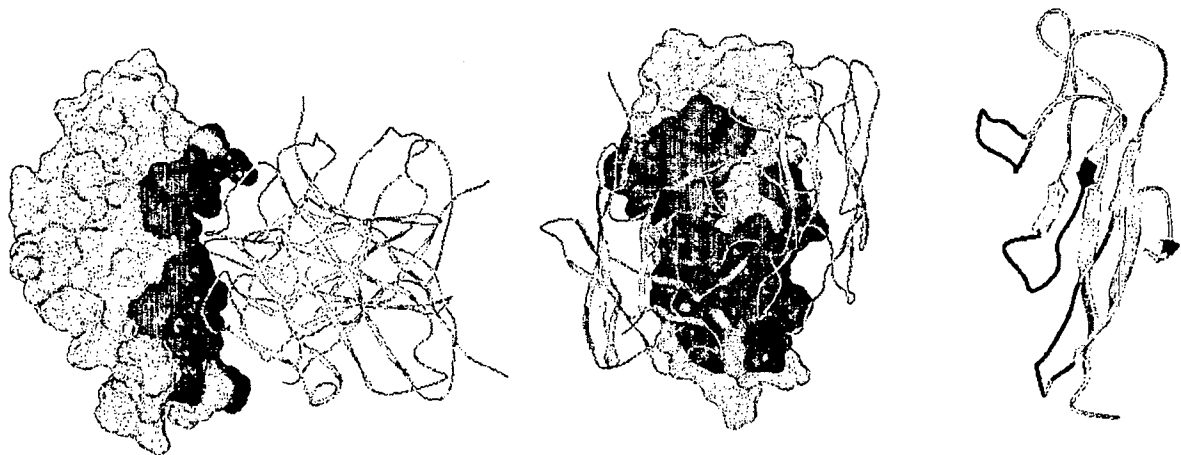


FIG. 2

225

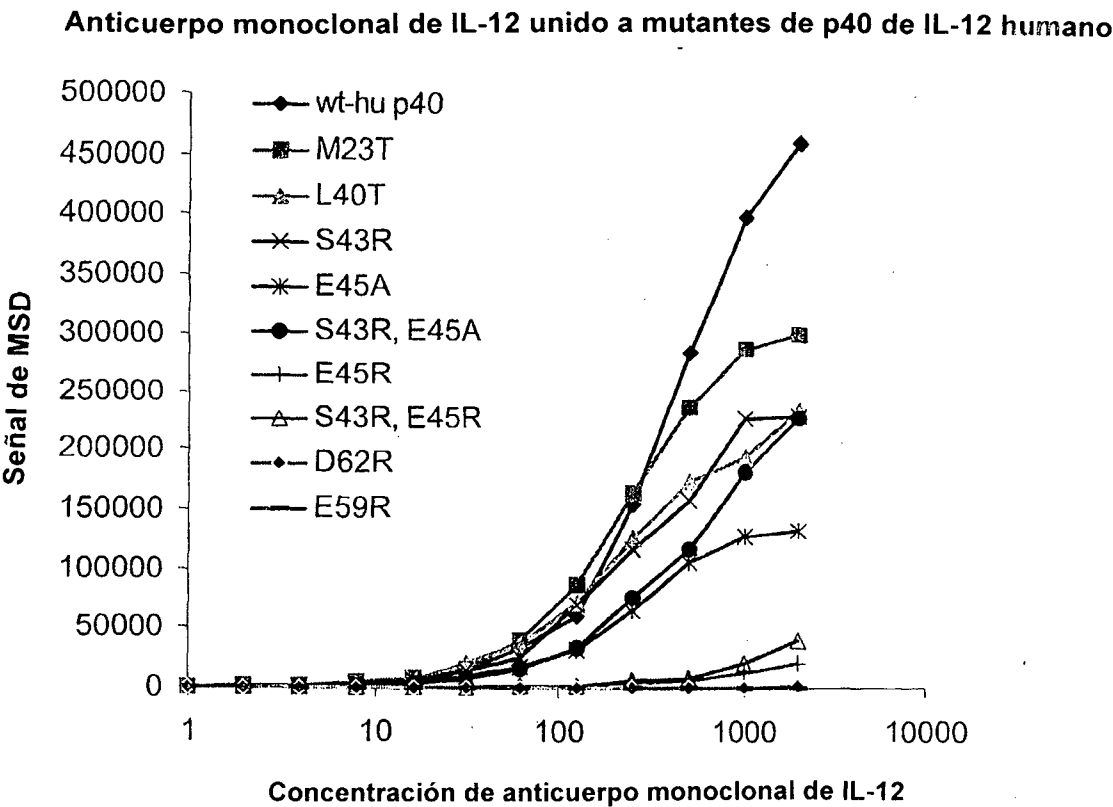


FIG. 3

226

CNTO 1275 unido a mutantes de p40 de IL-12 humano

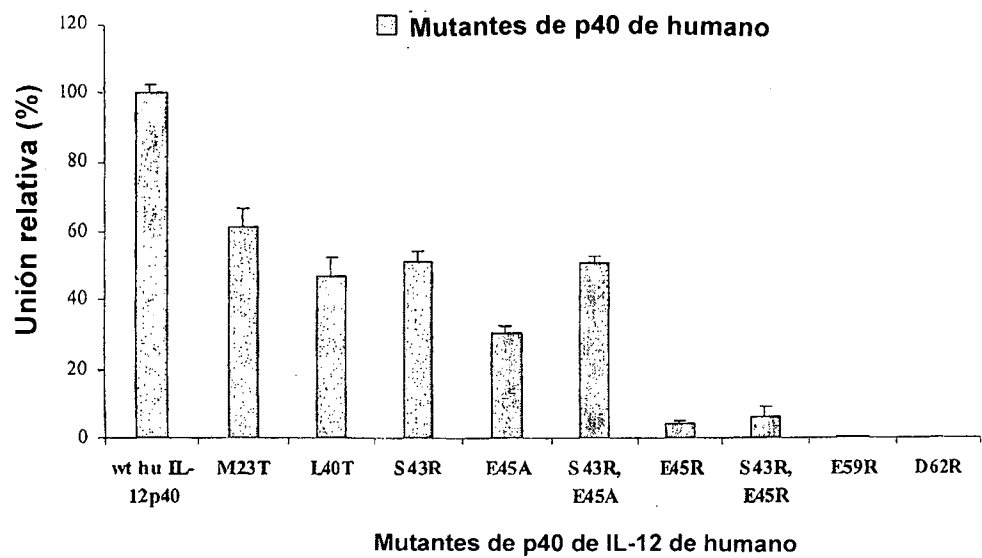


FIG. 4

227

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
29 June 2006 (29.06.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2006/069036 A2**

(51) International Patent Classification: Not classified

(74) Agent: DICTER, Eric; One Johnson & Johnson Plaza,  
New Brunswick, NJ 08933 (US).

(21) International Application Number:  
PCT/US2005/046063

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
20 December 2005 (20.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/637,819 21 December 2004 (21.12.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): CENTO-  
COR, INC. [US/US]; One Johnson & Johnson Plaza, New  
Brunswick, NJ 08933 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GILES-KOMAR,  
Jill [US/US]; 31 Blakely Road, Downingtown, PA 19335  
(US). HEAVNER, George [US/US]; 9 Oak Glen Drive,  
Malvern, PA 19355 (US). KNIGHT, David [US/US];  
2430 Whitehorse Road, Berwyn, PA 19312 (US). LUO,  
Jinquan [CN/US]; 46 Knickerbocker Lane, Malvern,  
PA 19355 (US). PERITT, David [US/US]; 407 Con-  
shohocken State Road, Bala Cynwyd, PA 19004 (US).  
SCALLON, Bernard [US/US]; 730 Outpost Circle,  
Wayne, PA 19087 (US). SHEALY, David [US/US]; 1351  
Pennsridge Place, Downingtown, PA 19335 (US).

Published:

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-IL-12 ANTIBODIES, EPITOPES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES



(57) Abstract: An anti-IL-12 antibody that binds to a portion of the IL-12 protein corresponding to at least one amino acid residue selected from the group consisting of residues 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 and 58-62 of the amino acid sequence of the p40 subunit of IL-12, including isolated nucleic acids that encode at least one anti-IL-12 antibody, vectors, host cells, transgenic animals or plants, and methods of making and using thereof have applications in diagnostic and/or therapeutic compositions, methods and devices.

WO 2006/069036 A2



No. 07-062847- -00000-0000

Fecha: 2007-06-21 16:07:40 Dep. 2020 NUECREACIONE  
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

**INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**SUPERINTENDENCIA**

### REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10  
 Conmutador: 3 82 08 40  
 Fax: 350 52 20  
 E-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)  
 Bogotá, D.C., Colombia