

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C.

Tel: 6069700 Fax: 6069704

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-135361- -00010-0000

Fecha: 2012-09-07 16:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 363

Act. 523 RESPUESTA

Folios: 449

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. L

Re: PI.-ABBOTT LABORATORIES.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40".-Clase C07K 14/715.-Expediente número 07-135.361.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado mediante fijación en lista de 8 de Junio de 2012.
2. Con el fin de responder a las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **09987** con respecto a la Concisión y la presencia de materia exenta de patentabilidad dentro del capítulo reivindicatorio, así como también la Unidad de Invención, la Novedad y el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan satisfactoriamente dichas objeciones.
3. **SOLICITUD DIVISIONAL.**

En primera instancia, me permito manifestar que, debidamente autorizado por el solicitante, y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución No. 00210 de 15 de Enero de 2001, se ha dividido la presente solicitud de patente en dos **(2)** solicitudes, a saber:

(1) Una solicitud **original** compuesta por **12** reivindicaciones que encuentran su sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio actualmente presentado a ese Despacho con la presente solicitud número **07-135.361**, y que corresponden específicamente a las realizaciones más preferidas de la materia contenida en las reivindicaciones **1, 2, 34, 44, 47, 50, 54, 58, 72, 106, 107 y 108** que actualmente se encuentran bajo estudio, sobre las cuales se han hecho modificaciones y restricciones con el fin de superar las objeciones de concisión de la solicitud hechas por el Señor Examinador, tal como se expondrá más adelante en este mismo memorial.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio de la solicitud número **07-135.361 original**, se encuentra ahora dirigido a proteger las proteínas de unión preferidas de la invención y las composiciones farmacéuticas que las contienen.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

(2) Una solicitud fraccionada número **07-135.361A** que presenta un nuevo capítulo reivindicatorio constituido por **116** reivindicaciones que encuentran su sustento tanto en la descripción como en el capítulo reivindicatorio originalmente presentados, donde las reivindicaciones además se refieren a algunas realizaciones particulares de la invención que se encuentran ejemplificadas dentro de la descripción.

En relación con lo anterior me permito señalar que los capítulos reivindicatorios tanto de la solicitud original como de la nueva solicitud divisional cuentan con pleno sustento en la descripción de la solicitud en estudio, y no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada toda vez que estos reclaman materia que se encuentra cubierta por el alcance del capítulo reivindicatorio actualmente en estudio.

4. Acompaño los documentos que detallo a continuación, relacionados con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

(1) SOLICITUD No. 07-135.361: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40".

(a) Recibo número 12-0080495 que acredita el pago de la tasa establecida para las reivindicaciones adicionales; y

(b) Nuevo capítulo reivindicatorio modificado compuesto por **12** reivindicaciones que comprende las realizaciones más preferidas de las reivindicaciones 1, 2, 34, 44, 47, 50, 54, 58, 72, 106, 107 y 108 actualmente presentadas, cuyo sustento se encuentra adicionalmente en la descripción de la solicitud número **07-135.361** inicialmente radicada el 21 de Diciembre de 2007.

(2) SOLICITUD DIVISIONAL A: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40".

(a) Recibo número 12-0074657, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;

(b) Resumen, Objeto y Finalidad de la invención y Páginas 1 a 196 del texto de la descripción que corresponden al originalmente presentado en la solicitud número **07-135.361**;

(c) Páginas **197 a 234** del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por **116** reivindicaciones basadas en la descripción y el capítulo reivindicatorios originalmente presentados;

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

(d) Páginas 1 a 68 del listado de secuencias que corresponden a las originalmente presentadas en la solicitud número **07-135.361**;

(e) Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1;

(f) Tarjeta de propietario;

(g) Fotocopia del documento que acredita a la suscrita ALICIA LLOREDA y/o al doctor GUSTAVO TAMAYO, y/o a la doctor IGNACIO SANTAMARIA y/o a al doctor ENRIQUE ALVAREZ, en los términos del Párrafo 1º del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **ABBOTT LABORATORIES**, organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América y domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América;

(h) Fotocopia del documento que acredita el traspaso que los autores del invento de la referencia, hacen a favor de mi representado de sus derechos sobre el mismo junto con su Traducción Oficial No. 2008-02-28-119; y

(i) Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes.

5. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Ahora bien, con respecto a las ya mencionadas objeciones presentadas por el Señor Examinador, en el ya referenciado Oficio No. **09987** se objeta la concisión del capítulo reivindicatorio actualmente presentado, señalando que la reivindicación 1 posee un gran número de posibilidades de sustitución a nivel del dominio de unión a antígeno.

Asimismo, el señor Examinador indica que las reivindicaciones 3, 5, 7-10, 17-19, 23-28, 62-64, 66-71, 89-99, 102 y 103 contienen expresiones que dificultan determinar la extensión del objeto que se busca proteger.

Del mismo modo, también se añade que las reivindicaciones 1, 34-61, 78-83 y 107 utilizan expresiones que son resultados a alcanzar que no definen a la proteína reclamada.

Adicionalmente, el señor Examinador afirma que las reivindicaciones 72-77 y 102 no son concisas toda vez que no se evidencia en la descripción que se puedan llegar a formar "cristales" de la proteína reclamada.

Sumado a lo anterior, objeta la concisión de la reivindicación 100 indicando que este no define de manera adecuada las etapas y condiciones particulares para llevar a cabo el método reclamado.

El señor Examinador también objeta la reivindicación 110 indicando que esta reclama combinaciones de la proteína de unión con una gran multitud de agentes, lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger.

Finalmente el señor Examinador objeta las reivindicaciones 105, 109 y 111-116 toda vez que reclaman métodos de tratamiento.

Con respecto a estas objeciones me permito manifestar que el solicitante ha modificado el capítulo reivindicatorio de forma que ahora se definen concisa y claramente las proteínas de unión que se une a una subunidad p40 de IL-12 correspondientes a realizaciones más preferidas de la invención.

En conexión con lo anterior me permito resaltar que este capítulo reivindicatorio modificado no se constituye de ninguna manera en una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está restringiendo la reclamación a las proteínas de unión preferidas de la invención en concordancia con las enseñanzas de la descripción de la solicitud, como se expone a continuación:

Reivindicación 1: Corresponde a una limitación de la materia contenida en las reivindicaciones 1 y 2 actualmente presentadas, en donde para la proteína de unión que se une a una subunidad p40 de IL-12 las seis CDRs del dominio de unión a antígeno han sido limitadas a seis secuencias CDR identificadas en el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino 1D4 descrito en el Ejemplo 1.2 (ver páginas 147 a 153 de la descripción) y mostrado en la Tabla 5 de la descripción de la solicitud (ve página 71).

En vista de lo anterior, la reivindicación 1 ahora modificada de la solicitud se lee como sigue:

"Una proteína de unión que posee un dominio de unión a antígeno, en donde dicha proteína de unión se une a una subunidad p40 de IL-12 y en donde dicho dominio de unión a antígeno posee seis CDRs: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, en donde:

CDR-H1 es: K-S-V-M-G-V-S (residuos 31-37 de SEQ ID NO:35),
 CDR-H2 es: H-I-Y-W-D-D-D-K-Y-Y-N-P-S-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO:35),
 CDR-H3 es: R-G-I-R-S-A-M-D-Y (residuos 100-108 de SEQ ID NO:35),
 CDR-L1 es: K-A-S-Q-S-V-S-N-D-V-A (residuos 24-34 de SEQ ID NO:36),
 CDR-L2 es: Y-A-S-N-R-Y-T (residuos 50-56 de SEQ ID NO:36),
 y
 CDR-L3 es: Q-Q-D-Y-N-S-P-W-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO:36)."

Reivindicación 2 y 3: Corresponden a realizaciones preferidas de la proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1 ahora modificada, en donde la proteína de unión posee uno de los pares mencionados de dominios VH y VL (que poseen las mismas secuencias CDR definidas en la reivindicación 1 modificada).

Sustento para los pares de dominios variables mencionados en estas nuevas reivindicaciones se encuentra en el texto de la descripción de la solicitud actualmente presentada, por ejemplo, en los ejemplos de proteínas de unión funcionales de CDR injertada descritas en el Ejemplo 2.2.2 (ver páginas 156 a 159) y mostradas en la Tabla 7 (ver páginas 82 a 86), en los ejemplos de proteínas de unión híbridas funcionales descritas en el Ejemplo 2.3.2 y la Tabla 14 (ver páginas 161 a 163), y en los ejemplos de proteínas de unión humanizadas funcionales descritas en el Ejemplo 2.3.4 y en la Tabla 16 (ver páginas 165 a 168).

Reivindicaciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11: Corresponden de manera respectiva a las reivindicaciones 34, 44, 47, 50, 54, 58, 72 y 106 actualmente presentadas o a parte de la materia contenida en las mismas para limitar el capítulo reivindicatorio de conformidad con las limitaciones realizadas a la reivindicación 1.

Reivindicación 12: Corresponde a la materia de las reivindicaciones 107 y 108 actualmente presentadas a fin de definir aún más la materia ahora reclamada.

Por otro lado me permito señalar que las reivindicaciones 3 a 33, 35 a 43, 45, 46, 48, 49, 51-53, 55-57, 59-71, 73 a 105 y 109 a 116 ya **no hacen parte** del capítulo reivindicatorio ahora modificado.

Como consecuencia de lo anterior, el capítulo reivindicatorio modificado está constituido por **12** reivindicaciones que describen de manera clara y concisa las realizaciones preferidas de la invención.

Así las cosas, es evidente que la proteína de unión objeto de la presente solicitud ahora se reclama de manera clara y concisa toda vez que la reivindicación 1 ha sido limitada especificando las secuencias de las seis CDRs de dicha proteína de

unión, y como será evidente para la persona medianamente versada en la materia son las secuencias CDRs las que le brindan a una proteína de unión sus características de unión a un sitio de unión de antígeno particular.

Sumado a esto, me permito señalar que la proteína de unión ahora reclamada es una proteína de unión que además de tener como características técnicas esenciales a las seis secuencias CDRs mencionadas en la reivindicación 1, también tiene la característica de unirse a la subunidad p40 de IL-12.

En este sentido, me permito manifestar que la mención dentro de la reivindicación 1 a "se une a una subunidad p40 de IL-12" corresponde a una **característica técnica funcional** de la proteína de unión reclamada, así como las características de las reivindicaciones 4, 5 y 6 del capítulo reivindicatorio que se adjunta a este memorial, características que le permiten a la persona versada en la materia reconocer más fácilmente la relación que hay entre las características técnicas esenciales de la invención, tal como es contemplado dentro del "Instructivo Examen De Solicitudes De Patentes de Invención y Modelo de Utilidad"¹, documento recientemente preparado por la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia el cual pretende reunir los lineamientos básicos con los cuales se evalúan las solicitudes de patente en Colombia, en donde bajo su numeral 2.6.5.4 refiriéndose a las características esenciales de una reivindicación señala (página 40):

- Características técnicas funcionales:

Las características técnicas funcionales son los elementos que conforman las invenciones, descritos en términos de su uso o su función. No definen la invención, pero explican la relación que hay entre sus diversas características estructurales. Por ejemplo: aparato que tiene, además un "elemento para medir la presión".

Las reivindicaciones deben incluir características estructurales y funcionales cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia no sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos. Por ejemplo: (Lo subrayado son características funcionales):

Por otro lado, las reivindicaciones pueden incluir características estructurales y funcionales cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos. Por ejemplo:

Casos en que las características funcionales:	
<u>Deben</u> incluirse	Cuando para el experto en la materia <u>no sea obvio</u> el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos
<u>Pueden</u> incluirse	para el experto en la materia <u>sea obvio</u> el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos

¹ http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/propiedad_industrial/Formatos/PI02-I06.pdf

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Consecuentemente, es claro que dentro de la reivindicación 1 ahora modificada la expresión "*se une a una subunidad p40 de IL-12*", dentro de la reivindicación 4 la expresión "*se une a un objetivo*", dentro de la reivindicación 5 la expresión "*modula una función biológica de un objetivo*" y dentro de la reivindicación 6 la expresión "*neutraliza una función biológica de un objetivo*", corresponden a características técnicas funcionales de la proteína de unión reclamada por la solicitud, las cuales le permiten a la persona versada en la materia establecer con mayor facilidad la relación que hay entre las características técnicas esenciales de la proteína de unión objeto de la solicitud, razón por la cual queda completamente superada la objeción que en este sentido presentó el señor Examinador frente a las respectivas reivindicaciones 1, 34, 44, 47 actualmente presentadas que ahora hacen parte de las reivindicaciones 1, 4, 5 y 6 modificadas, tal como se expuso anteriormente.

Por lo tanto, queda completamente claro que la persona medianamente versada en la materia que leyera la descripción de la presente solicitud estaría en capacidad de entender claramente y reproducir sin ambigüedad las proteínas de unión que se unen a una subunidad p40 de IL-12 y que poseen las seis CDRs de conformidad con la reivindicación 1 ahora modificada, así como cualquiera de sus reivindicaciones dependiente, teniendo en cuenta tales conocimientos del estado del arte comprenden la clonación y secuenciación de CDRs (Ejemplo 1 de la solicitud) así como injertar secuencias CDR en otras regiones variables aceptoras para formar moléculas de anticuerpo con CDR injertado, híbridas y humanizadas (véase el Ejemplo 2 de la solicitud).

Por otro lado, en cuanto a la objeción de concisión realizada por el señor Examinador frente a la reivindicación 72 actualmente presentada toda vez que no se evidencia en la descripción que se puedan llegar a formar "cristales" de la proteína reclamada, respetuosamente me permito manifestar que la persona versada en la materia es conciente que los avances realizados en la última década sobre la cristalización a gran escala de moléculas de anticuerpo encontradas en la naturaleza y creadas recombinantemente, han convertido dicha práctica de cristalización de moléculas de anticuerpo en una **práctica rutinaria**.

Además, para dicha persona versada en la materia también es conocido que los cristales obtenidos por tal cristalización a gran escala han mostrado que poseen características que son particularmente deseables para usos farmacéuticos, aun cuando no son apropiados para estudios precisos por cristalografía de rayos X.

A este respecto, y a modo de ejemplo, me permito resaltar que una gran variedad de técnicas de cristalización a gran escala que están disponibles en este campo son descritas en la publicación PCT No. WO 02072636, publicada el 19 de Septiembre de 2002, (Shenoy et al.), **la cual también se cita en la descripción**

de la presente solicitud (ver ultimo párrafo de la página 92 de la descripción de la solicitud) **para hacer referencia a las técnicas por medio de las cuales se puede obtener la proteína de unión cristalizada de la invención.**

En vista de lo anterior es evidente que la persona versada en la materia está capacitada para de manera rutinaria producir cristales de proteínas complejas, tal como moléculas de anticuerpos diseñados, utilizando métodos estandarizados de cristalización a gran escala.

Aunado a lo anterior me permito señalar que tales moléculas cristalinas de anticuerpo tienen uso farmacéutico pero difieren considerablemente de aquellas utilizadas en estudios de cristalografía clásica de rayos X.

En este sentido, me permito dirigir la atención de ese Despacho a por ejemplo la tabla de la página 6 de WO 02072636 la cual proporciona un resumen comparativo de las características técnicas requeridas para cristalografía de rayos X y aquellas de las obtenidas para uso farmacéutico con los métodos de cristalización a gran escala. De esta tabla se observa que mientras la calidad del cristal es muy importante para realizar medidas de precisión en estudios de cristalografía de rayos X, no es este el caso para los cristales producidos por métodos de cristalización a gran escala para uso farmacéutico pues los cristales de moléculas de anticuerpos producidas usando métodos de cristalización a gran escala como se describe en WO 02072636 son suficientemente puros para estudios farmacéuticos y fabricación de productos farmacéuticos, retienen la actividad biológica, son particularmente adecuados para almacenamiento (como cristales de anticuerpos están menos sujetos a reacciones no deseadas que puedan ocurrir en solución), pueden ser usados en composiciones de administración parenteral que contienen concentraciones muy altas de moléculas de anticuerpo biológicamente activo, entre otras (véanse por ejemplos las páginas 6 a 10 de dicha referencia). Los ejemplos proporcionados en el documento de Shenoy et al. Incluyen la cristalización a gran escala y formulación de proteínas de unión bien conocidas, terapéuticamente activas, y comercialmente relevantes como rituximab (disponible comercialmente como Rituxan[®]) el cual es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a CD20; trastuzumab (disponible comercialmente como Herceptin[®]), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que se use a HER-2; e infliximab (disponible comercialmente como Remicade[®]) que es un anticuerpo monoclonal que se une a TNF- α humano.

Consecuentemente, la cristalización a gran escala de tales moléculas de anticuerpo multiméricas, comercialmente relevantes demuestran claramente como la industria farmacéutica explota las ventajas de las formas cristalinas de moléculas de anticuerpo importantes sin los altos costos, dificultades, exactitud y precisión

requeridos para la producción de cristales empleados en estudios de cristalografía de rayos-X.

Así las cosas, los progresos que han ocurrido en la última década en la cristalización a gran escala de moléculas de anticuerpo diseñadas, anteriormente descritos, ponen de manifiesto que para la persona versada en la materia que tenga la oportunidad de leer la descripción de la presente solicitud sabría claramente como preparar cristales de las proteínas de unión p40/IL-12 reclamadas, mediante el uso de métodos estándar bien conocidos en este campo.

Por lo tanto, me permito señalar que la eliminación de la reivindicación 10 del capítulo reivindicatorio ahora modificado, que hace referencia al cristal de la proteína de unión reclamada, sería una restricción injusta al alcance de la presente invención, toda vez que un tercero podría fabricar un cristal de la proteína de unión reclamada por la solicitud en cuestión mediante las enseñanzas de la presente invención y utilizando métodos bien conocidos de cristalización a gran escala de moléculas de anticuerpo y podría usufructuar dicho cristal de proteína de unión que tendría algunas propiedades termodinámicas mejoradas frente a la proteína de unión como tal, las cuales estaría asociadas a su estructura cristalina, pero que seguiría suministrando una proteína de unión obtenida a partir de las enseñanzas de la presente solicitud y sus conocimientos básicos en el campo al que pertenece la invención.

Consecuentemente, la persona versada en la materia reconocerá que la reclamación de la proteína de unión de la invención que es un cristal, reivindicación 10 del capítulo reivindicatorio ahora modificado, es totalmente válida y justa dado que dicho cristal de proteína de unión puede ser obtenido a partir de las revelaciones de la presente solicitud y los conocimientos básicos del estado del arte sobre cristalización a gran escala de moléculas de anticuerpo.

Por otro lado, me permito señalar que en vista de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio quedan completamente superadas las demás objeciones de concisión presentadas por el señor Examinador en su concepto técnico antes referenciado.

En vista de lo anterior, me permito señalar que es evidente que el capítulo reivindicatorio modificado se refiere únicamente a materia patentable y es totalmente claro y conciso al reclamar las proteínas de unión preferidas de la invención, y por lo tanto dicho capítulo reivindicatorio modificado se ajusta completamente a lo estipulado por las disposiciones de la Decisión Andina 486 de 2000.

6. **UNIDAD DE INVENCION**

A este respecto el señor Examinador manifiesta que el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud cubre diversos grupos inventivos toda vez que no guarda un concepto inventivo común porque los documentos WO 0056772 (D1) y WO 02097048 (D2) ya revelaban anticuerpos que se unen a la subunidad p40 de IL-12 y que comprenden las SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO:59.

En respuesta a esta objeción me permito dirigir la atención de ese Despacho al hecho que todas las reivindicaciones del capítulo reivindicatorio modificado, que se presenta junto con este memorial, poseen como características comunes las características técnicas de la reivindicación 1 ahora modificada, que es una proteína de unión **que (1) se une a una subunidad p40 de IL-12 y (2) que posee cada una de las seis secuencias CDR específicas mencionadas en la nueva reivindicación 1.**

Tales características técnicas que poseen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por el capítulo reivindicatorio no habían sido reveladas en ninguno de los documentos D1 o D2, tal como expondrá a continuación, razón por la cual el capítulo reivindicatorio ahora modificado de la presente solicitud goza de unidad de invención.

7. **NOVEDAD DE LA SOLICITUD**

El señor Examinador señala que la presente solicitud carecería de novedad a la luz de las enseñanzas de los documentos **WO 0056772 (D1)** y **WO 02097048 (D2)**, asegurando que las proteínas de unión allí reveladas anticiparían aquellas que son reclamadas por la presente solicitud.

Sobre este particular me permito manifestar que existen diferencias significativas entre las enseñanzas de los citados documentos y el objeto de la presente invención que hacen que dichos documentos no anticipen la materia reclamada, tal como se discute a continuación.

7.1. **Novedad de la solicitud frente a las enseñanzas del documento WO 0056772 (D1)**

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que las características esenciales de las proteínas de unión reveladas en la reivindicación 1 ya habían sido divulgadas previamente en el documento D1, toda vez que dicha anterioridad *"enseña un anticuerpo capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12 que comprende el CDR-H1 de secuencia SEQ ID NO:3 SYGMH (Pág. 143, línea 14 y Pág*

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

151, líneas 18-29), que corresponden al CDR-H1 de la SEQ ID NO: 55 de la presente solicitud."

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar que el capítulo reivindicatorio ahora modificado de la solicitud en cuestión presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas del documento D1, atentamente me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

(a) La reivindicación 1 ahora modificada de la solicitud de patente en cuestión se encuentra dirigida a proteger una proteína de unión que posee un dominio de unión a antígeno, en donde:

- dicha proteína de unión se une a una subunidad p40 de IL-12,
- en donde dicho dominio de unión a antígeno posee seis CDRs: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, en donde:
- CDR-H1 es: K-S-V-M-G-V-S (residuos 31-37 de SEQ ID NO:35),
- CDR-H2 es: H-I-Y-W-D-D-D-K-Y-Y-N-P-S-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO:35),
- CDR-H3 es: R-G-I-R-S-A-M-D-Y (residuos 100-108 de SEQ ID NO:35),
- CDR-L1 es: K-A-S-Q-S-V-S-N-D-V-A (residuos 24-34 de SEQ ID NO:36),
- CDR-L2 es: Y-A-S-N-R-Y-T (residuos 50-56 de SEQ ID NO:36),
- y
- CDR-L3 es: Q-Q-D-Y-N-S-P-W-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO:36).

(b) Por su parte el documento D1 básicamente revela anticuerpos humanos recombinantes que se unen específicamente a IL-12 humana, en donde dichos anticuerpos pueden ser un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión a antígeno del mismo.

Tales antígenos revelados en D1 pueden comprender diferentes secuencias CDRs que se presentan a lo largo del texto de la solicitud, en donde de manera particular se pueden señalar las CDR de las secuencias de dominio variable de cadena pesada (VH) y de dominio variable de cadena ligera (VL) que se presentan en la Tabla de las páginas 45 a 47, así como también las diferentes SED IDs para las secuencias de dominio variable de cadena pesada (VH) y de cadena ligera (VL) del anticuerpo, que se muestran en las Tablas 1 a 3 del Apéndice A de las páginas 124 a 134 de D1. (véase también el Listado de Secuencias presentado para D1)

De manera aún más particular, D1 revela en sus páginas 140 y 141 las CRDs de las secuencias VL y VH del anticuerpo Y61 y en la página 143 revela las mismas CDRs para las secuencias VL y VH del anticuerpo J695 generado por mutagénesis del anticuerpo Y61, tales secuencias VL y VH se muestran a continuación:

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Secuencias peptídicas de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo Y61:

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 23)

CDR L1

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISC SGGRSNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2

GNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYC

CDR L3

QSYDRGTHPALL FGTGTKVTVLG (SEQ ID NO:24)

Secuencias peptídicas de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo J695:

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 31)

CDR L1

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISC SGSRNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2

YNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYC

CDR L3

QSYDRYTHPALL FGTGTKVTVLG (SEQ ID NO: 32)

En relación con lo anterior, me permito señalar que dentro del ámbito de las patentes es un hecho aceptado que para afectar la novedad de una solicitud el arte previo debe divulgar **de manera explícita** todas y cada una de las características

técnicas de la invención, tal como por ejemplo lo señalan la Guía para el examen de solicitudes en la Oficina Europea de Patentes²:

*"Un documento le quita la novedad a cualquier materia reclamada **derivable de manera directa y sin ambigüedades** a partir de ese documento que incluye todos las características implícitas para una persona versada en el arte el cual está expresamente mencionado en el documento (...)*

***La limitación de materia "derivable de manera directa y sin ambigüedades" a partir del documento es importante.** Así, cuando se está considerando la novedad, no es correcto interpretar la enseñanzas de un documento como que comprende equivalentes bien conocido que no son revelados en los documentos; esto es un asunto de obviedad".*

Adicionalmente, me permito señalar que en el Manual Andino de Patentes, -una guía práctica que no constituye un marco normativo para el estudio y análisis de patentabilidad de una solicitud en trámite, se establece lo siguiente en relación con el requisito de novedad:

"Para determinar la novedad de la invención, se debe comprobar si existen anticipaciones del estado de la técnica que contengan explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención. El examen de novedad se efectúa comparando elemento por elemento de la invención tal como está definido por las reivindicaciones con los del estado de la técnica."
³(Resaltado fuera del texto).

Sumado a esto, considero también pertinente resaltar que para que la novedad de una invención se vea afectada por un documento del estado de la técnica, dicho documento debe revelar de manera idéntica la invención reclamada, tal como es contemplado dentro del "Instructivo Examen De Solicitudes De Patentes de Invención y Modelo de Utilidad"⁴, documento recientemente preparado por la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia el cual pretende reunir los lineamientos básicos con los cuales se evalúan las solicitudes de patente en Colombia, en donde bajo su numeral 2.12 refiriéndose a la novedad de una solicitud señala que:

*"- Verificar, según la comparación anterior, si la invención reivindicada es **idéntica** a lo revelado en el estado de la técnica, en cuyo caso se considera que no tiene novedad" (página 62) (resaltado fuera de texto).*

² European Patent Office, "Guidelines for Examination in the European Patent Office" Munich, Abril 2010. Parte C, Capítulo IV-27 y -28, numeral 9.2.

³ SECRETARÍA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA. Manual para el examen de solicitudes de patentes de invención en las Oficinas de propiedad industrial de los Países de la Comunidad Andina; Lima: Perú; 2004. Páginas 65 y 66.

⁴ http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/propiedad_industrial/Formatos/PI02-I06.pdf

Consecuentemente, en el contexto de las patentes es claro que para que un documento afecte la novedad de una solicitud, este debe revelar de manera **explícita y específica todas y cada una de las características de la invención interactuando de la misma manera que lo hacen en la solicitud, es decir que sea idéntica.**

(c) Visto lo anterior es absolutamente claro que **el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión es novedoso frente a las enseñanzas de D1 porque dicha anterioridad de ninguna manera divulga una proteína de unión que posea un dominio de unión a antígeno que tenga las seis CDRs CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 que tienen todas las proteínas ahora reclamadas por la presente solicitud.** En efecto es claro que el documento D1 revela anticuerpos que también se unen específicamente a IL-12 pero **D1 no revela ningún anticuerpo que tenga las seis (6) CDRs de las proteínas de unión de la presente solicitud,** tal como se reclama ahora en la reivindicación 1 modificada, **las cuales son la característica técnica esencial que diferencia la presente invención del estado del arte comprendido en D1.**

Por lo tanto, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas del documento D1, cumpliendo a cabalidad con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 16 de la Decisión 486 de 2000.

7.2. Novedad de la solicitud frente a las enseñanzas del documento WO 02097048 (D2)

Por otro lado, el documento D2 también hace referencia a anticuerpos que se unen específicamente a IL-12. Sin embargo de la lectura atenta de dicho documento y del análisis detallado de las secuencias de SEQ ID Nos: 1 a 9 presentadas en las páginas 1 a 4 del Listado de Secuencias de dicho documento, para la persona versada en la materia **saltará a la vista que ninguno de los anticuerpos divulgados en D2 posee un dominio de unión a antígeno que tenga las seis CDRs CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 que tienen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por la presente solicitud, tal como se reclama ahora en la reivindicación 1 modificada del capítulo reivindicatorio que se adjunta a este memorial, y esto básicamente porque dichas seis CDRs no se revelan en D2.**

Consecuentemente es absolutamente claro que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión es novedoso frente a las enseñanzas de D2 porque dicha anterioridad de ninguna manera presenta un anticuerpo con todas las seis (6) CDRs de la proteína de unión de la presente solicitud, **las cuales son la característica**

técnica esencial que diferencia la presente invención del estado del arte comprendido en D2.

Por lo tanto, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter novedoso frente a las enseñanzas del documento D2, cumpliendo a cabalidad con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 16 de la Decisión 486 de 2000.

8. NIVEL INVENTIVO DE LA SOLICITUD

Finalmente, el señor Examinador objeta el nivel inventivo de la reivindicación 2 de la presente invención con base en las enseñanzas de los siguientes documentos **WO 0056772 (D1)** y **WO 02097048 (D2)**.

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que la diferencia entre la invención definida en la reivindicación 2 y los anticuerpos de D1 y de D2 consiste en las secuencias de los CDR de la solicitud y en que dichos CDR son obtenidos de un anticuerpo murino.

Sin embargo, el señor Examinador señala que teniendo en cuenta que D1 ya divulgada un anticuerpo capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12 que comprende el CDR-H1 de secuencia SEQ ID NO:3, SYGMH (pág 143, línea 14 y pág. 151, líneas 18-29) que corresponde al CDR-H1 de la SEQ ID NO: 55 de la presente solicitud, y teniendo en cuenta que D2 muestra un anticuerpo que se une a la subunidad p40 de IL-12 (pág. 60, líneas 4-6) que comprende el CDR-L1 de secuencia RASENIDTYLH (pág. 24, líneas 16-30 y SEQ ID NO:4) que corresponde a la SEQ ID NO: 58 de la presente solicitud y el CDR-L2 de secuencia YASQSIG (pág. 24, líneas 16-30 y SEQ ID NO:5) que corresponde a la SEQ ID NO 59 de la presente solicitud, la persona del oficio medianamente versada en la materia habría inferido sin mucho esfuerzo de su parte, generar un anticuerpo como el 1D4 que comprende las SEQ ID NO: 35 y 36, para obtener mas anticuerpos con la misma actividad. Sostiene también que la persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a obtener mas anticuerpos con la misma actividad basada en las secuencias consenso de D1 y D2 y teniendo en cuenta herramientas conocidas en el estado del arte para predecir localizaciones específicas de segmentos de las regiones variables de un anticuerpo (señalando el documento de B. Lo. Anticuerpos engineering. Capítulo 2: The Kabat Database and Bioinformatics Example. Methods in Molecular Biology, Vol 248, II, pág. 11-23, 2004).

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar que el capítulo reivindicatorio ahora modificado de la solicitud en cuestión presenta un inequívoco carácter

inventivo frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, atentamente me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

(a) Tal y como se mencionó previamente en el presente memorial, el documento D1 de ninguna manera divulga las seis secuencia CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 del dominio de unión a antígeno que tienen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por la solicitud. En efecto, es claro que el documento D1 enseña CDRs de un anticuerpo que también se une a la subunidad p40 de IL-12 como las proteínas de unión de la presente solicitud, pero dichas CDRs enseñadas en D1 no corresponden con las seis CDRs que contienen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por la solicitud en estudio.

(b) De manera similar, el documento D2 revela anticuerpos que al igual, que las proteínas de unión de la presente solicitud, se unen a la subunidad p40 de IL-12. Sin embargo, las CDRs allí reveladas para dichos anticuerpos no corresponden con las secuencia CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 del dominio de unión a antígeno que tienen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por la solicitud.

Por lo tanto, dado que los documentos D1 y D2 citados por el señor Examinador no enseñan las secuencias CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 que tienen todas las proteínas de unión ahora reclamadas por la solicitud en cuestión y en vista que las CRDs de los anticuerpos revelados en estos dos documentos son muy diferentes a tales seis CDRs de las proteínas de la presente invención, es claro que la persona versada en la materia no encontraría en D1 y en D2 ninguna enseñanza o sugerencia que junto con sus conocimientos de las herramientas conocidas en el estado del arte para predecir localizaciones específicas de segmentos de las regiones variables de un anticuerpo (B. Lo. Anticuerpos engineering. Capítulo 2: The Kabat Database and Bioinformatics Example. Methods in Molecular Biology, Vol 248, II, pág. 11-23, 2004), lo condujera de manera obvia o evidente a desarrollar proteínas de unión con tales seis CDRs de las proteínas de unión de la invención en cuestión. En vista de lo anterior dicha persona versada en la materia tampoco encontraría obvio o evidente a partir de las enseñanzas de D1 y D2 y sus conocimientos ya mencionados en el campo técnico, que las proteínas con tales seis CDRs de la invención en estudio tendrían buena actividad para neutralizar la IL-12 tal como se muestra por ejemplo en la Tabla 18 de la página 168 de la solicitud para los anticuerpos 1D4.6, 1D4.7, 1D4.8 y 1D4.9 que comprenden las seis CDRs reclamadas en la reivindicación 1 ahora modificada.

Dentro de este marco de ideas me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente⁵:

⁵ Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

Así, dado que a partir de los documentos D1 y D2 y su combinación y junto con los conocimientos ya mencionados en el campo técnico no "salta a la vista de manera clara y directa" una proteína de unión que tiene las seis CDRs que tienen todas las proteínas de unión ahora reclamados en la reivindicación 1 modificada, en donde dicha proteína se une a la subunidad p40 de IL-12; y que de las enseñanzas de dichos documentos no se tiene ninguna "certeza clara y manifiesta" de que tales proteínas de unión con dichas seis CDRs de la invención en estudio tendrían buena actividad para neutralizar la IL-12, es evidente que la materia reclamada por la reivindicación 1 del capítulo reivindicatorio ahora modificado conlleva nivel inventivo frente a los citados documentos D1 y D2 y su combinación, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

Consecuentemente, me permito manifestar que las reivindicaciones 2 a 10 del capítulo reivindicatorio modificado (que se adjunta al presente memorial) también conllevan nivel inventivo frente a las enseñanzas de tales documentos D1 y D2 y su combinación, por cuanto son reivindicaciones dependientes de la nueva reivindicación 1. Así también, las reivindicaciones 11 y 12 del capítulo reivindicatorio ahora modificado también resultan inventivas frente a las enseñanzas de los documentos citados por el señor Examinador por cuanto contienen la proteína de unión inventiva de la nueva reivindicación 1.

9. CONCLUSION

Para finalizar me permito resaltar que el capítulo reivindicatorio modificado que se anexa a este memorial es totalmente claro y conciso al reclamar las proteínas de unión objeto de la presente invención, así como la composición farmacéutica que contiene dichas proteínas de unión, en concordancia con las enseñanzas de los ejemplos específicos proporcionados en la descripción de la solicitud. Dicho capítulo

reivindicatorio ahora modificado solo hace referencia a materia patentable con lo cual se ajusta completamente a las disposiciones de la Decisión Andina 486 de 2000.

Adicionalmente, se estableció que dicho capítulo reivindicatorio modificado que se adjunta al presente memorial goza de unidad de invención gracias a las características técnicas comunes que comparten todas las proteínas de unión de la invención en cuestión.

Por otro lado, en virtud de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio y de los argumentos discutidos con respecto a los documentos D1 y D2 se estableció que la materia objeto de la presente solicitud no es anticipada por dichos documentos y por lo tanto es nueva.

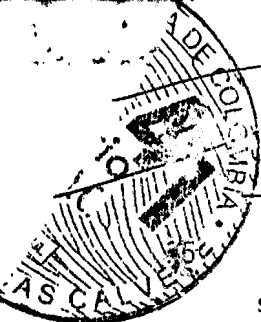
Finalmente, en virtud de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio y de los argumentos discutidos con respecto a los documentos citados D1 y D2 se estableció de manera incontrovertible que la persona versada en la materia no podría obtener de manera obvia o evidente a partir de las enseñanzas de estos documentos, las proteínas de unión que son objeto de la presente invención y que tampoco podría haber esperado de manera obvia o evidente que tales proteínas con las seis CDRs mencionadas en la nueva reivindicación 1, que caracterizan las proteínas de unión reclamadas, condujeran a obtener proteínas de unión con buena actividad para neutralizar la IL-12, y por lo tanto es irrefutable el Nivel Inventivo que conlleva la nueva reivindicación 1 de la presente solicitud y sus reivindicaciones dependientes, así como las reivindicaciones 11 y 12 que corresponden a composiciones que contienen tales proteínas.

10. En cuanto a la reivindicación de la prioridad respecto de la solicitud divisional, es la misma invocada en la solicitud original, la cual fue reivindicada oportunamente en Fase Internacional, de las solicitudes números US 60/695.679 de 30 de Junio de 2005.

11. Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es **ABBOTT LABORATORIES**; organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América y domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

12. Así mismo, reitero a usted que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en dicha sociedad para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado junto con la solicitud original el 21 de Diciembre de 2007.

13. De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.



JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

14. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con: CC. 39.690.713 y tarjeta profesional de abogado No. 39.690.713 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 36)

05 SET 2012
Bogotá D.C.
Alicia Lloreda Ricaurte
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén
FIRMA DE LA (EL) COMPARECIENTE

Jose Lloreda Camacho
C.C. 1015893.017



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0080495
		Bogotá D.C., Agosto 06 de 2012 - 17:18:10

RECIBIDO DE : LLORED A & CIA. S.A.	NI 830.022.145
------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455215600	06/08/2012	16.780.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00 60.000.00
			\$60.000.00

SON: **SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-135361- -00010-0000
Fecha: 2012-09-07 16:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 363

Reivindicaciones

Abbott Laboratories

Exp. 07-135.361

Reivindicamos:

1. Una proteína de unión que posee un dominio de unión a antígeno, en donde dicha proteína de unión se une a una subunidad p40 de IL-12 y en donde dicho dominio de unión a antígeno posee seis CDRs: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3, en donde:

CDR-H1 es: K-S-V-M-G-V-S (residuos 31-37 de SEQ ID NO:35),

CDR-H2 es: H-I-Y-W-D-D-D-K-Y-Y-N-P-S-L-K-S (residuos 52-67 de SEQ ID NO:35),

CDR-H3 es: R-G-I-R-S-A-M-D-Y (residuos 100-108 de SEQ ID NO:35),

CDR-L1 es: K-A-S-Q-S-V-S-N-D-V-A (residuos 24-34 de SEQ ID NO:36),

CDR-L2 es: Y-A-S-N-R-Y-T (residuos 50-56 de SEQ ID NO:36),

y

CDR-L3 es: Q-Q-D-Y-N-S-P-W-T (residuos 89-97 de SEQ ID NO:36).

2. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión posee una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) y una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) seleccionadas del grupo que consiste de:

SEQ ID NO:35 para VH y SEQ ID NO:36 para VL,

SEQ ID NO:61 para VH y SEQ ID NO:62 para VL,

SEQ ID NO:63 para VH y SEQ ID NO:64 para VL,

SEQ ID NO:65 para VH y SEQ ID NO:66 para VL,

SEQ ID NO:65 para VH y SEQ ID NO:36 para VL,

SEQ ID NO:35 para VH y SEQ ID NO:62 para VL,

SEQ ID NO:80 para VH y SEQ ID NO:81 para VL,

SEQ ID NO:82 para VH y SEQ ID NO:83 para VL,

SEQ ID NO:84 para VH y SEQ ID NO:85 para VL, y

SEQ ID NO:86 para VH y SEQ ID NO:87 para VL.

3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) es SEQ ID NO: 82 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) es SEQ ID NO: 83.

4. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha proteína de unión se une a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 humana e IL-23 humana.

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de unión modula una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 humana e IL-23 humana.

6. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de unión neutraliza una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 humana e IL-23 humana.
7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad on (K_{on}) a dicho objetivo de mínimo $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ medida por resonancia de plasmón superficial.
8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad off (K_{off}) a dicho objetivo de máximo 10^{-3}s^{-1} medida por resonancia de plasmón superficial.
9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha proteína de unión tiene una velocidad de disociación (K_D) a dicho objetivo de máximo 10^{-7}M .
10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión es un cristal.
11. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable funciona como un adyuvante útil para aumentar la absorción o dispersión de dicha proteína de unión, en donde dicho adyuvante es hialuronidasa.

DIVISIONAL
ABOTT LABORATORIES
EXPEDIENTE No. 07-135.361A

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-135.361A

54. TÍTULO "PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/715

71. SOLICITANTE ABBOTT LABORATORIES

DOMICILIO ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS,
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 07 SEP 2012

(FORMA P 10)

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

ABBOTT LABORATORIES

Nombre o denominación / Nombre o razón social

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre del representante legal

Tipo de empresa: ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☒ Otra

39.690.713 de Usaquén

Documento de identificación: C.C. ☒ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estado de Illinois	100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América	Abbott Park
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloedacamacho.com	6069701	3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Apellidos y Nombre

39.690.713 de Usaquén

documento de identificación

53.215

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Calle 72 No 5-83 piso 5to		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloedacamacho.com	6069701	3264270

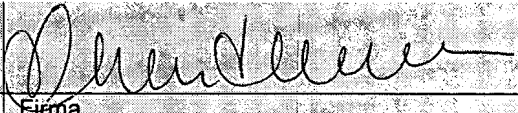
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente <u>07-135.361</u> De: <u>07-135.361</u> A: <u>07-135.361A</u>	Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No <u>12-0074657</u>	Fecha <u>23/07/12</u>
---	-----------------------

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
ALICIA LLOREDA RICAURTE	
Nombre y apellidos	Firma
39.690.713 de Usaquén	53.215
C.C	Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

16

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0074657
		Bogotá D.C., Julio 23 de 2012 - 17:06:01

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452484620	23/07/2012	23.224.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-135361- -00010-0000

Fecha: 2012-09-07 16:16:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 363

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 27 dn 2012 - 10:45:27

17

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-07-29-362
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español, dado y firmado el 12 de julio de 2004.

(firma: ilegible)

Laura J. Schumacher ✓

Vicepresidente, Secretaria y Asesora General Suplente ✓

Certificado Notarial (Sociedad), documento escrito en inglés y en español.

(firma: ilegible)

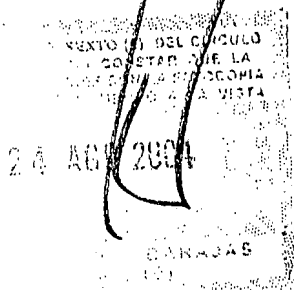
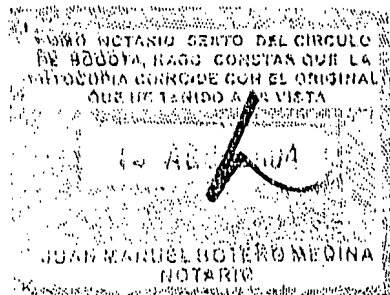
Notario Público

Sello Oficial

Trina Lee Ruiz ✓

Notario Público, Estado de Illinois

Mi Comisión Expira el 6-11-2007 ✓



A
(18)

Estado de Illinois
Secretario de Estado
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 Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

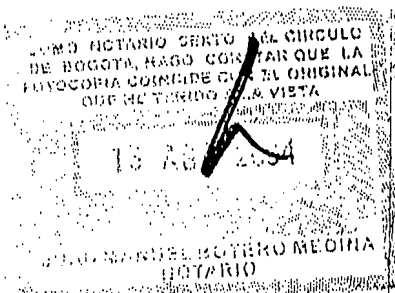
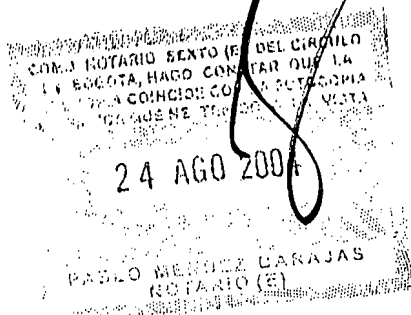
5. en Springfield, Illinois
6. el 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
10. Firma: ilegible
- Sello del Estado de Illinois

Jesse White
Secretario de Estado
Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 29 de julio de 2004,
en la ciudad de Bogotá, D.C. por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial,
Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



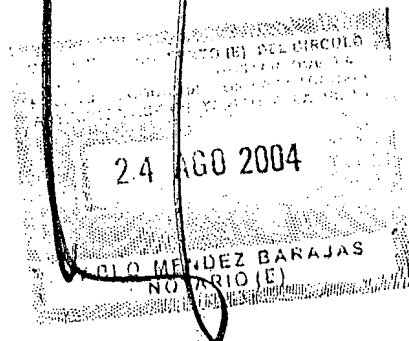
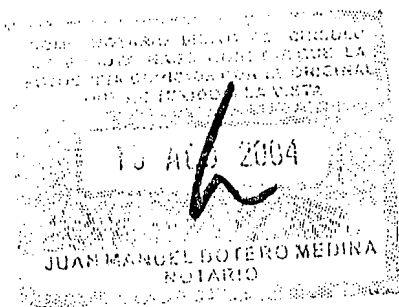
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

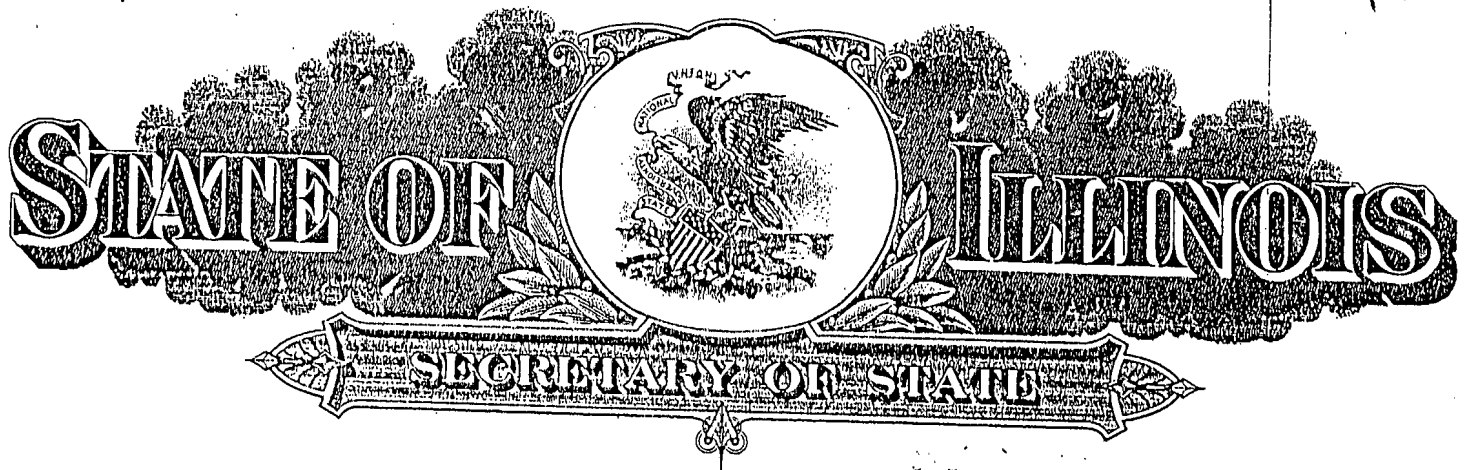
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

24 JUL 2004
Anita Escobar
CUNATEWA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUENTES INDICADAS

20 JUL 2004 A H: 38

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
SECRETARIA D.C.





SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by TRINA LEE RUIZ

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois

6. JULY 20, 2004

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. S04VB11001

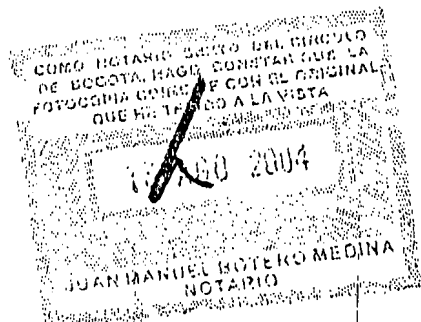
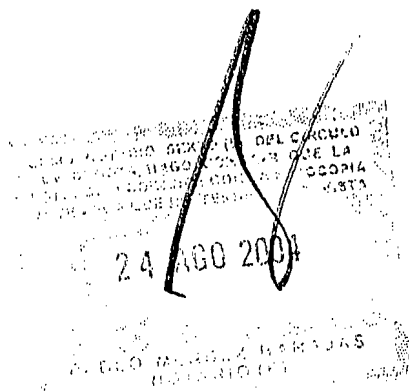
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004

24 AGO 2004
PABLO MENDEZ BARRERA
NOTARIO (E)

15 JUL 2004
ESTEREO MEDINA

21

The undersigned, ABBOTT LABORATORIES, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

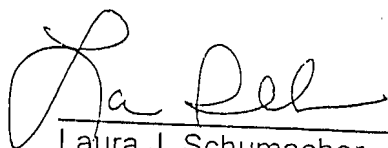
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of July, 2004



Laura J. Schumacher
Vice President, Secretary and Deputy General
Counsel


24 AGO 2004
PABLO MÉNDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

COMO NOTARIO SANTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 AGO 2004
JUAN MANUEL DE TEJERA MEDINA
NOTARIO

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de (ss)
Condado de
Hoy 12 de Julio de 2004, compareció
Laura J. Schumacher, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es Vice Presidenta, Secretaria y Asesora
de ABBOTT

LABORATORIES, la compañía nombrada en el
documento que antecede, una sociedad
debidamente organizada y existente conforme a las
leyes del Estado de Illinois, Estados
Unidos de América, domiciliada en la ciudad de
Abbott Park, Condado de Lake
Estado de Illinois, Estados Unidos de
América, legalmente constituida para un período de
duración que aún no ha terminado, que ejerce su
objeto social conforme a las leyes del Estado de
Illinois, Estados Unidos de América;
que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder; que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Chicago
Estado de Illinois, con fecha Sep. 12, 2003,
y certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of (ss)
County of
On this 12th day of July, 2004,
personally
came
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that she is the Vice President
Secretary and Deputy General Counsel
of ABBOTT

LABORATORIES, the company named within, a
Corporation organized and existing under the laws of
the State of Illinois, United
States of America, domiciled at the City of Abbott Park
County of Lake

State of Illinois, United States of America,
legally constituted for a period of tenure not yet
expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of the State of Illinois,
United States of America; that the deponent is
authorized by said Company to confer this power of
attorney; that the seal affixed hereunto by the
deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that the
purpose for which this instrument is granted is
included within the corporate purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Chicago, State of Illinois, under date of
September 12, 2003, and hereby
certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
facts therein contained are true, which he attests.

Trina Lee Ruiz
OFFICIAL SEAL
TRINA LEE RUIZ
NOTARY PUBLIC, STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES 6-11-2007

24 AGO 2004

COMO NOTARIO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 AGO 2004
JUAN MANUEL SOTERO MEDINA
NOTARIO

239

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 21-12-07 (30) Prioridad (31) No. Prioridad 60/695,679 (32) Fecha 30-06-05 (33) País US (51) Int Cl: C07K 14/715 (71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES (72) Inventor(es): LACY, Susan E.; FUNG, Emma; BELK, Jonathan P.; DIXON, Richard W.; ROGUSKA, Michael; HINTON, Paul R. y KUMAR, Shankar. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-01-08 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 29-06-06 No. de solicitud: PCT/US2006/025584 (87) Publicación internacional Fecha: 11-01-07 No. publicación: WO 2007/005608 A2	
(54) Título: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40"	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, dicha proteína de unión es capaz de unirse a una subunidad p40 de IL-12, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

- CDR-H1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 55), en donde;
- X₁ es D, K, T, o S;
 - X₂ es Y, S, o T;
 - X₃ es Y, V, G, W, S, o F;
 - X₄ es I, o M;
 - X₅ es H, G, E, o V;
 - X₆ es V, o no está presente; y
 - X₇ es S, o no está presente;
- CDR-H2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇- X₁₈-X₁₉-X₂₀ (SEQ ID NO: 56), en donde;
- X₁ es H, D, G, W, S, Y o R;
 - X₂ es I, o F;
 - X₃ es Y, W, L, S, N, D o G;
 - X₄ es W, P, H, T, o S;
 - X₅ es D, G, E, A, o I;
 - X₆ es D, G, S, T, o N;
 - X₇ es D, G, S, o P;
 - X₈ es K, N, S, E, T, o H;
 - X₉ es Y, T, P, I, o N;
 - X₁₀ es Y, N, T, H, K, S, or G;
 - X₁₁ is N, o Y;
 - X₁₂ es P, N, A, D, o S;
 - X₁₃ es S, E, D, o P;
 - X₁₄ es L, K, D, T o Y;
 - X₁₅ es K, F, V, M, R, o A;
 - X₁₆ es S, K, Q, P, o no está presente;
 - X₁₇ es D, G, R, o no está presente;
 - X₁₈ es F, o no está presente;
 - X₁₉ es Q, o no está presente; y

X₂₀ es D, o no está presente;

CDR-H3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO: 57), en donde;

X₁ es R, N o W;

X₂ es G, T, R, P, o H;

X₃ es I, R, F, Y, o Q;

X₄ es R, V, Y, F, o A;

X₅ es S, N, G, A, o R;

X₆ es A, Y, L, F, o M;

X₇ es M, A, D, L, o F;

X₈ es D, M, Y, o W;

X₉ es Y, D, o N;

X₁₀ es Y, A, o no está presente;

X₁₁ es M, o no está presente;

X₁₂ es D, o no está presente; y

X₁₃ es Y, o no está presente;

CDR-L1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID NO: 58), en donde;

X₁ es K, o R;

X₂ es A;

X₃ es S;

X₄ es Q, o E;

X₅ es S, o N;

X₆ es V, o I;

X₇ es S, G, o D;

X₈ es N, T, o K;

X₉ es D, N, o Y;

X₁₀ es V, G, o L;

X₁₁ es A, I, o H;

X₁₂ es S, o no está presente;

X₁₃ es F, o no está presente;

X₁₄ es M, o no está presente; y

X₁₅ es N, o no está presente;

CDR-L2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈ (SEQ ID NO: 59), en donde;

X₁ es Y, o S;

X₂ es A, o T;

X₃ es S, o A;

X₄ es N, H, S, o Q;

X₅ es R, N, o S;

X₆ es Y, Q, o I;

X₇ es T, S, o G; y

X₈ es S, o no está presente;

y

CDR-L3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 60), en donde;

X₁ es Q;

X₂ es Q;

X₃ es D, Y, o S;

X₄ es Y, N, K, o I;

X₅ es N, T, S, o E;

X₆ es S, Y, V, o W;

X₇ es P;

X₈ es W, F, Y, L, o P; y

X₉ es T, o S.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 21-12-07	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/715			
(71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES			
(72) Inventor(es): LACY, Susan E.; FUNG, Emma; BELK, Jonathan P.; DIXON, Richard W.; ROGUSKA, Michael; HINTON, Paul R. y KUMAR, Shankar.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/695,679	30-06-05	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-01-08		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 11-01-07	
Fecha de presentación de la solicitud: 29-06-06		No. publicación: WO 2007/005608 A2	
No. de solicitud: PCT/US2006/025584			
(54) Título: PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40			

24 12
26

PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención abarca proteínas de unión a IL12-p40, particularmente anticuerpos que se unen a la interleucina-12 humana (hIL-12) y/o IL-23 humana (hIL-23). Específicamente, la invención se relaciona con anticuerpos que son anticuerpos quiméricos, de CDR injertada y humanizados. Los anticuerpos preferidos tienen alta afinidad para hIL-12 y/o hIL-23 y neutralizan la actividad de hIL-12 y/o hIL-23 in vitro e in vivo. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de longitud total o una porción de unión a antígeno del mismo. También se provee el método para preparar y el método para usar los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos, o porciones de anticuerpo, de la invención son útiles para detectar hIL-12 y/o hIL-23 y para inhibir la actividad de hIL-12 y/o hIL-23, p.e., en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de hIL-12 y/o hIL-23 es perjudicial.

1
25
27

PROTEÍNAS DE UNIÓN A IL-12/P40

Referencia Cruzada con Solicitud Relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional US no. 60/695,679 presentada el 30 de Junio de 2005.

Esta solicitud está relacionada con la solicitud de Patente U.S. No. 09/534717 presentada el 24 de Marzo de 2000 (emitida como Patente U.S. Número 6,914,128) titulada "Anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humano y métodos para producirlos". Los contenidos completos de esta solicitud de patente, y patentes emitidas de allí, se incorporan en la presente por referencia.

Referencia al acuerdo de investigación conjunta

Los contenidos de esta solicitud están bajo un acuerdo de investigación conjunta celebrado por y entre Protein Design Labs, Inc. y Abbott Laboratories el 14 de Diciembre de 2005, y está dirigido a anticuerpos diseñados recombinantemente.

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con proteínas de unión IL-12p40, y específicamente a sus usos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas.

Antecedentes de la Invención

La interleucina-12 humana (IL-12) es una citoquina con una estructura única de efectos pleiotrópicos (Kobayashi, et al. (1989) J Exp Med 170:827-

28

845; Seder, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-10192, Ling, et al. (1995) J Exp Med 154:116-127; Podlaski, et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237). La IL-12 juega un papel crítico en la patología asociada con varias enfermedades que involucran las respuestas inmune e inflamatoria. Una revisión de IL-12, sus actividades biológicas, y su papel en la enfermedad se puede encontrar en Trinchieri, G. (2003) Nat. Rev. Immun. 3:133- 146. Estructuralmente, la IL-12 es una proteína heterodimérica (referida como la "proteína p70") que comprende una sub-unidad de 35 kDa (p35) y una sub-unidad de 40 kDa (p40) que están enlazadas mediante un puente de disulfuro. La proteína heterodimérica es producida principalmente por células que presentan antígeno tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Estas células también secretan un exceso de la sub-unidad p40 con relación a la sub-unidad p70. Las subunidades p40 y p35 no están relacionadas genéticamente y ninguna ha sido reportada por poseer actividad biológica, aunque el homodímero p40 puede funcionar como un antagonista de IL-12.

Funcionalmente, la IL-12 juega un papel central en la regulación del balance entre antígeno-linfocitos tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) de cooperadores T específicos de T. Las células Th1 y Th2 gobiernan la iniciación y progresión de trastornos autoinmunes, y la IL-12 es crítica en la regulación de la diferenciación y maduración del linfocito Th1. Las citoquinas liberadas por las células Th1 son inflamatorias e incluyen interferón gamma (IFN- γ), IL-2, y linfoxina (LT). Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 para facilitar la inmunidad humoral, reacciones alérgicas, e inmunosupresión. Consistente con la preponderancia de las respuestas de Th1 en enfermedades inflamatorias y las actividades proinflamatorias de la IFN- γ , la IL-12 juega un papel importante en la patología asociada con muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), soriasis (PS) y enfermedad de Crohn (CD).

27/29

Los pacientes humanos con MS han demostrado un aumento en la expresión de IL-12 documentada por los niveles de mRNA p40 en placas MS agudas (Windhagen et al., (1995) J Exp. Med. 182:1985-1996). Adicionalmente, la estimulación ex vivo de las células que presentan antígeno con células T que expresan CD40L de pacientes MS produjo producción de IL-12 aumentada comparada con las células T de control, consistente con la observación que las interacciones CD40/CD40L son inductores potentes de la IL-12. Se han detectado niveles elevados de IL-12 p70 en el sinovia de pacientes RA comparado con controles saludables (Morita et al. (1998) Arth. and Rheumat. 41:306-314). El perfil de expresión de ácido ribonucleico del mensajero de citoquina (mRNA) en el sinovia RA identificó principalmente citoquinas Th1 (Bucht et al. (1996) Clin. Exp. Immunol. 103:347-367). La IL-12 también parece jugar un papel crítico en la patología asociada con la enfermedad de Crohn. Se ha observado la expresión aumentada de EMF- γ e IL-12 en la mucosa intestinal de pacientes con esta enfermedad (Fais et al. (1994) J Interferon Res. 14:235-238; Parronchi et al. (1997) Am. J. Path. 150:823-832; Monteleone et al. (1997) Gastroent. 112:1169-1178, y Berrebi et al. (1998) Am. J Path 152:667-672). El perfil de secreción de citoquina de las células T de la lámina propia de pacientes CD es característico de una respuesta principalmente de Th1, incluyendo en gran parte niveles de IFN- γ aumentados (Fuss, et al. (1996) J Immunol. 157:1261-1270). Más aún, las secciones de tejido del colon de pacientes con CD muestra una abundancia de macrófagos que expresan IL-12 y células T que expresan IFN- γ (Parronchi et al (1997) Am. J. Path. 150:823-832).

La IL-23 también es una citoquina heterodimérica y pertenece a una familia de las cinco citoquinas heterodiméricas incluyendo IL-12 e IL-27 (Trinchieri et al., (2003) Immunity 19:641-644). La IL-23 comparte la sub-unidad p40 idéntica a IL-12, pero está asociada con una sub-unidad p19 mediante un enlace disulfuro. La sub-unidad p19 está estructuralmente relacionada con la

IL-6, el factor estimulador de colonia de granulocito (G-CSF), y la sub-unidad p35 de IL-12. La IL-23 es producida por tipos de células similares a las IL-12, y su receptor está expresado en las células T, células NK, y células fagocíticas y hematopoyéticas dendríticas. La IL-23 media la señalización mediante la unión a un receptor heterodimérico, comprendido de IL-23R e IL-12beta1. La sub-unidad IL-12beta1 es compartida por el receptor de IL-12, que está compuesto de IL-12beta1 e IL-12beta2. IL-23 no comparte funciones de superposición con IL-12 (induciendo la producción de IFN- γ , la diferenciación de célula Th1 y la activación de las funciones que presentan antígeno de las células dendríticas), sin embargo induce selectivamente la proliferación de células T de memoria (Oppmann et al. (2000) *Immunity* 13:715-725, Parham, et al. (2002) *J. Immunol.* 168:5699-5708).

El papel de la IL-23 en la inflamación autoinmune ha sido disectado en parte a través de estudios con ratones con p19 eliminada (Murphy et al. *J Exp Med* 198:1951-1957; Cua et al. (2003) *Nature* 421:744-748). Los estudios han demostrado que la IL-23 modula la respuesta inmune a la infección (ver, p.e., Pirhonen, et al. (2002) *J. Immunol.* 169:5673-5678; Broberg, et al. (2002) *J. Interferon Cytokine Res.* 22:641-651; Elkins, et al. (2002) *Infection Immunity* 70:1936-1948; Cooper, et al. (2002) *J. Immunol.* 168:1322-1327). Se piensa que la IL-23 juega un papel en las enfermedades inmuno-mediadas in (Langrish et.al. (2004) *Immunological Reviews* 202: 96-105).

Debido al papel de la IL-12 humana en una variedad de trastornos humanos, se ha diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de IL-12. En particular, los anticuerpos que se enlazan a, y neutralizan la IL-12 se han visto como un medio para inhibir la actividad de IL-12. Algunos de los primeros anticuerpos eran anticuerpos monoclonales murinos (mAbs), secretados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con IL-12 (ver p.e., Strober et al., *Publicación PCT* No.

29/3/97

WO 97/15327; Gately et al., WO9937682 A2; Neurath et al., J Exp. Med 182:1281-1290 (1995); Duchmarm et al., J Immunol. 26:934- 938(1996)). Estos anticuerpos IL-12 murinos están limitados para su uso *in vivo* debido a los problemas asociados con la administración de anticuerpos de ratón a humanos, tales como vida media en suero corta, una inhabilidad para desencadenar ciertas funciones efectoras humanas u producción de respuesta inmune no deseada contra el anticuerpo de ratón en un humano (la reacción del "anticuerpo anti-ratón humano" (HAMA)).

Un criterio para superar los problemas asociados con el uso de anticuerpos totalmente murinos en humanos es generar anticuerpos totalmente humanos tales como los revelados en Salfeld et al., Publicación PCT No. WO 00/56772 A1. Otros criterios para superar los problemas asociados con el uso de anticuerpos totalmente murinos en humanos han involucrado diseñar genéticamente los anticuerpos para que sean más "tipo humano". Por ejemplo, se han preparado anticuerpos quiméricos, en los cuales las regiones variables de las cadenas del anticuerpo son derivadas de murino y las regiones constantes de las cadenas del anticuerpo son derivadas de humano (Junghans, et al. (1990) Cancer Res. 50:1495-1502; Brown et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2663-2667; Kettleborough et al. (1991) Prot. Engineer. 4:773-783). Tales anticuerpos quiméricos a IL-12 también se revelan en Peritt et al. Publicación PCT No. WO2002097048A2. Sin embargo, como estos anticuerpos quiméricos aún retienen secuencias de cadena variable murina, aún pueden producir una reacción inmune no deseada, la reacción del anticuerpo anti-quimérico humano (HACA) especialmente cuando se administra por períodos prolongados.

Existe una necesidad en la técnica de anticuerpos mejorados capaces de unirse a la sub-unidad p40 de la IL-12 (IL-12p40). Preferiblemente, los anticuerpos se unen a IL-12 y/o IL-23. Preferiblemente, los anticuerpos son

capaces de neutralizar la IL-12 y/o IL-23. La presente invención provee una familia novedosa de proteínas de unión, anticuerpos con CDR injertada, anticuerpos humanizados, y fragmentos de los mismos, capaces de unirse a IL-12p40, unirse con afinidad alta, y unirse y neutralizar la IL-12 y/o IL-23.

Resumen de la Invención

Esta invención se refiere a proteínas de unión a IL-12p40, particularmente anticuerpos capaces de unirse a la sub-unidad p40 de IL-12 humana y la sub-unidad p40 de IL-23 humana. Además, la invención provee métodos para preparar y usar las proteínas de unión a IL-12p40.

Un aspecto de esta invención se relaciona con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de unirse a una subunidad p40 de IL-12. En una realización el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

CDR-H1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 55), en donde;

X_1 es D, K, T, o S;

X_2 es Y, S, o T;

X_3 es Y, V, G, W, S, o F;

X_4 es I, o M;

X_5 es H, G, E, o V;

X_6 es V, o no está presente; y

X_7 es S, o no está presente;

CDR-H2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} - X_{19} - X_{20} (SEQ ID NO: 56), en donde;

X_1 es H, D, G, W, S, Y o R;

X₂ es I, o F;
X₃ es Y, W, L, S, N, D o G;
X₄ es W, P, H, T, o S;
X₅ es D, G, E, A, o I;
X₆ es D, G, S, T, o N;
X₇ es D, G, S, o P;
X₈ es K, N, S, E, T, o H;
X₉ es Y, T, P, I, o N;
X₁₀ es Y, N, T, H, K, S, or G;
X₁₁ is N, o Y;
X₁₂ es P, N, A, D, o S;
X₁₃ es S, E, D, o P;
X₁₄ es L, K, D, T o Y;
X₁₅ es K, F, V, M, R, o A;
X₁₆ es S, K, Q, P, o no está presente;
X₁₇ es D, G, R, o no está presente;
X₁₈ es F, o no está presente;
X₁₉ es Q, o no está presente; y
X₂₀ es D, o no está presente;

CDR-H3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO: 57), en donde;

X₁ es R, N o W;
X₂ es G, T, R, P, o H;
X₃ es I, R, F, Y, o Q;
X₄ es R, V, Y, F, o A;
X₅ es S, N, G, A, o R;
X₆ es A, Y, L, F, o M;
X₇ es M, A, D, L, o F;
X₈ es D, M, Y, o W;

X_9 es Y, D, o N;
 X_{10} es Y, A, o no está presente;
 X_{11} es M, o no está presente;
 X_{12} es D, o no está presente; y
 X_{13} es Y, o no está presente;

CDR-L1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} (SEQ ID NO: 58), en donde;

X_1 es K, o R;
 X_2 es A;
 X_3 es S;
 X_4 es Q, o E;
 X_5 es S, o N;
 X_6 es V, o I;
 X_7 es S, G, o D;
 X_8 es N, T, o K;
 X_9 es D, N, o Y;
 X_{10} es V, G, o L;
 X_{11} es A, I, o H;
 X_{12} es S, o no está presente;
 X_{13} es F, o no está presente;
 X_{14} es M, o no está presente; y
 X_{15} es N, o no está presente;

CDR-L2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 (SEQ ID NO: 59), en donde;

X_1 es Y, o S;
 X_2 es A, o T;
 X_3 es S, o A;
 X_4 es N, H, S, o Q;
 X_5 es R, N, o S;

X_6 es Y, Q, o I;
 X_7 es T, S, o G; y
 X_8 es S, o no está presente;

y

CDR-L3. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 60), en donde;

X_1 es Q;
 X_2 es Q;
 X_3 es D, Y, o S;
 X_4 es Y, N, K, o I;
 X_5 es N, T, S, o E;
 X_6 es S, Y, V, o W;
 X_7 es P;
 X_8 es W, F, Y, L, o P; y
 X_9 es T, o S.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de los residuos 31-37 de SEQ ID NO.:35; residuos 52-67 de SEQ ID NO.:35; residuos 100-108 de SEQ ID NO.:35; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:36; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:36; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:36; residuos 31-37 de SEQ ID NO.:37; residuos 52-67 de SEQ ID NO.:37; residuos 100-109 de SEQ ID NO.:37; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:38; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:38; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:38; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:39; residuos 50-66 de SEQ ID NO.:39; residuos 99-106 de SEQ ID NO.:39; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:40; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:40; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:40; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:41; residuos 50-66 de SEQ ID NO.:41; residuos 99-106 de SEQ ID NO.:41; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:42; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:42; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:42; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:43; residuos 50-66 de

36 32
34

SEQ ID NO.:43; residuos 99-106 de SEQ ID NO.:43; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:44; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:44; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:44; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:45; residuos 50-66 de SEQ ID NO.:45; residuos 99-101 de SEQ ID NO.:45; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:46; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:46; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:46; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:47; residuos 50-66 de SEQ ID NO.:47; residuos 99-106 de SEQ ID NO.:47; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:48; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:48; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:48; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:49; residuos 50-66 de SEQ ID NO.:49; residuos 99-111 de SEQ ID NO.:49; residuos 24-38 de SEQ ID NO.:50; residuos 53-60 de SEQ ID NO.:50; residuos 93-101 de SEQ ID NO.:50; residuos 31-37 de SEQ ID NO.:51; residuos 52-67 de SEQ ID NO.:51; residuos 100-109 de SEQ ID NO.:51; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:52; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:52; residuos 89-97 de SEQ ID NO.:52; residuos 31-35 de SEQ ID NO.:53; residuos 47-66 de SEQ ID NO.:53;residuos 99-107 de SEQ ID NO.:53; residuos 24-34 de SEQ ID NO.:54; residuos 50-56 de SEQ ID NO.:54; y residuos 89-97 de SEQ E) NO.:54. En una realización preferida, la proteína de unión comprende al menos 3 CDRs seleccionadas del grupo de las secuencias descritas anteriormente. Más preferiblemente, las 3 CDRs seleccionadas son conjuntos de CDRs de dominio variable seleccionadas del grupo consistente de:

Conjunto de CDR 1D4 VH	
CDR-H1 1D4 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 35
CDR-H2 1D4 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 35
CDR-H3 1D4 VH	Residuos 100-108 de SEQ ID NO.: 35
Conjunto de CDR 1D4 VL	
CDR-L1 1D4 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 36
CDR-L2 1D4 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 36
CDR-L3 1D4 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 36

Conjunto de CDR 1A6 VH	
CDR-H1 1A6 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 37
CDR-H2 1A6 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 37
CDR-H3 1A6 VH	Residuos 100-109 de SEQ ID NO.: 37
Conjunto de CDR 1A6 VL	
CDR-L1 1A6 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 38
CDR-L2 1A6 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 38
CDR-L3 1A6 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 38
Conjunto de CDR 1D8 VH	
CDR-H1 1D8 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 39
CDR-H2 1D8 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 39
CDR-H3 1D8 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 39
Conjunto de CDR 1D8 VL	
CDR-L1 1D8 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 40
CDR-L2 1D8 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 40
CDR-L3 1D8 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 40
Conjunto de CDR 3G7 VH	
CDR-H1 3G7 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 41
CDR-H2 3G7 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 41
CDR-H3 3G7 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 41
Conjunto de CDR 3G7 VL	
CDR-L1 3GT VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 42
CDR-L2 3GT VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 42
CDR-L3 3GT VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 42
Conjunto de CDR 5E8 VH	
CDR-H1 5E8 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 43
CDR-H2 5E8 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 43
CDR-H3 5E8 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 43
Conjunto de CDR 5E8 VL	

CDR-L1 5E8 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 44
CDR-L2 5E8 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 44
CDR-L3 5E8 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 44
Conjunto de CDR 8E1 VH	
CDR-H1 8E1 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 45
CDR-H2 8E1 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 45
CDR-H3 8E1 VH	Residuos 99-101 de SEQ ID NO.: 45
Conjunto de CDR 8E1 VL	
CDR-L1 8E1 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 46
CDR-L2 8E1 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 46
CDR-L3 8E1 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 46
Conjunto de CDR 1H6 VH	
CDR-H1 1H6 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 47
CDR-H2 1H6 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 47
CDR-H3 1H6 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 47
Conjunto de CDR 1H6 VL	
CDR-L1 1H6 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 48
CDR-L2 1H6 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 48
CDR-L3 1H6 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 48
Conjunto de CDR 3A11 VH	
CDR-H1 3A11 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 49
CDR-H2 3A11 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 49
CDR-H3 3A11 VH	Residuos 99-111 de SEQ ID NO.: 49
Conjunto de CDR 3A11 VL	
CDR-L1 3A11 VL	Residuos 24-38 de SEQ ID NO.: 50
CDR-L2 3A11 VL	Residuos 53-60 de SEQ ID NO.: 50
CDR-L3 3A11 VL	Residuos 93-101 de SEQ ID NO.: 50
Conjunto de CDR 4B4 VH	
CDR-H1 4B4 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 51

39 25 38

CDR-H2 4B4 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 51
CDR-H3 4B4 VH	Residuos 100-109 de SEQ ID NO.: 51
Conjunto de CDR 4B4 VL	
CDR-L1 4B4 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 52
CDR-L2 4B4 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 52
CDR-L3 4B4 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 52
Conjunto de CDR 7G3 VH	
CDR-H1 7G3 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 53
CDR-H2 7G3 VH	Residuos 47-66 de SEQ ID NO.: 53
CDR-H3 7G3 VH	Residuos 99-107 de SEQ ID NO.: 53
Conjunto de CDR 7G3 VL	
CDR-L1 7G3 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 54
CDR-L2 7G3 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 54
CDR-L3 7G3 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 54

En una realización, la proteína de unión de la invención comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable. Más preferiblemente, los dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan de un grupo que consiste de: Conjunto de CDR 1D4 VH & Conjunto de CDR 1D4 VL; Conjunto de 1A6 VH & Conjunto de 1A6 VL; Conjunto de CDR 1D8 VH & Conjunto de CDR 1D8 VL; Conjunto de CDR 3G7 VH & Conjunto de CDR 3G7 VL; Conjunto de 5E8 VH & Conjunto de CDR 5E8 VL; Conjunto de CDR 8E1 VL & Conjunto de CDR 8E1 VL; Conjunto de CDR 1H6 VH & Conjunto de CDR 1H6 VL; Conjunto de CDR 3A11 VH & Conjunto de CDR 3A11 VL; Conjunto de CDR 4B4 VH & Conjunto de CDR 4B4 VL; y Conjunto de CDR 7G3 VH & Conjunto de CDR 7G3 VL.

En otra realización, la proteína de enlace revelada anteriormente comprende además un marco aceptor humano. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del

grupo que consiste de SEQ ID NO.:6; SEQ ID NO.:7; SEQ ID NO.:8; SEQ ID NO.:9; SEQ ID NO.: 10; SEQ ID NO.: 11; SEQ ID NO.: 12; SEQ ID NO.: 13; SEQ ID NO.: 14; SEQ ID NO.: 15; SEQ ID NO.: 16; SEQ ID NO.: 17; SEQ ID NO.: 18; SEQ ID NO.: 19; SEQ ID NO.:20; SEQ ID NO.:21; SEQ ID NO.:22; SEQ ID NO.:23; SEQ ID NO.:24; SEQ ID NO.:25; SEQ ID NO.:26; SEQ ID NO.:27; SEQ ID NO.:28; SEQ ID NO.:29; SEQ ID NO.:30; SEQ ID NO.:31; SEQ ID NO.:32; SEQ ID NO.:33; SEQ ID NO.:34, SEQ ID NO.:92, SEQ ID NO.:93, SEQ ID NO.:94, SEQ ID NO.:95, SEQ ID NO.:96, Y SEQ ID NO.:97.

En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo con CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a la sub-unidad p40 de IL-12 o IL-23. Preferiblemente, el anticuerpo con CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo, comprende una o más CDRs reveladas anteriormente. Más preferiblemente, el anticuerpo con CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.:61; SEQ ID NO.:62; SEQ ID NO.:63; SEQ ID NO.:64; SEQ ID NO.:65; SEQ ID NO.:66; SEQ ID NO.:67; SEQ ID NO.:68; SEQ ID NO.:69; SEQ ID NO.:70; SEQ ID NO.:71; SEQ ID NO.:72; SEQ ID NO.:73; SEQ ID NO.:74; SEQ ID NO.:75; SEQ ID NO.:76; SEQ ID NO.:77; y SEQ ID NO.:78. Lo más preferido, el anticuerpo con CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende dos dominios variables seleccionados del grupo revelado anteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo con CDR injertada o porción de unión a antígeno del mismo comprende un marco aceptor humano. Más preferiblemente, el marco aceptor humano es uno cualquiera de los marcos de aceptor humano revelados anteriormente.

En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12 o IL-23. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o

porción de unión a antígeno del mismo comprende una o más CDRs reveladas anteriormente incorporadas en un dominio variable de anticuerpo humano de un marco aceptor humano. Preferiblemente, el dominio variable de anticuerpo humano es un dominio variable humano de consenso. Más preferiblemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco en un residuo clave, en donde el residuo clave se selecciona del grupo que consiste de un residuo adyacente a una CDR; un residuo de sitio de glicosilación; un residuo raro; un residuo capaz de interactuar con una subunidad p40 de IL-12 humana; un residuo capaz de interactuar con una CDR; un residuo canónico; un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera; un residuo dentro de una zona Vernier; y un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat. Preferiblemente, el residuo clave se selecciona del grupo que consiste de 3H, 5H, 10H, 11H, 12H, 13H, 15H, 16H, 18H, 19H, 23H, 24H, 25H, 30H, 41H, 44H, 46H, 49H, 66H, 68H, 71H, 73H, 74H, 75H, 76H, 77H, 78H, 79H, 81H, 82H, 82AH, 82BH, 82CH, 83H, 84H, 85H, 86H, 87H, 89H, 93H, 98H, 108H, 109H, 1L, 2L, 3L, 7L, 8L, 9L, 10L, 11L, 12L, 13L, 15L, 17L, 19L, 20L, 21L, 22L, 36L, 41L, 42L, 43L, 45L, 46L, 58L, 60L, 62L, 63L, 67L, 70L, 73L, 74L, 77L, 78L, 79L, 80L, 83L, 85L, 87L, 104L, y 106L. Preferiblemente, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región Marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

En una realización preferida, la proteína de unión es un anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12 o IL-23. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado, o porción de unión de antígeno del mismo, comprende una o más CDRs

reveladas anteriormente. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende tres o más CDRs reveladas anteriormente. Lo más preferido, el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende seis CDRs reveladas anteriormente.

En otra realización de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo, comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.:79, SEQ ID NO.:80, SEQ ID NO.:81, SEQ ID NO.:82, SEQ ID NO.:83, SEQ ID NO.:84, SEQ ID NO.:85, SEQ ID NO.:86, SEQ ID NO.:87, SEQ ID NO.:88, SEQ ID NO.:89, SEQ ID NO.:90, SEQ ID NO.:91, SEQ ID NO.:98, SEQ ID NO.:99, SEQ ID NO.: 100, SEQ ID NO.: 101, SEQ ID NO.: 102, Y SEQ ID NO.: 103, SEQ ID NO.: 104, SEQ ED NO.: 105, SEQ ID NO.: 106, SEQ ID NO.: 107, SEQ ID NO.: 108, y SEQ ID NO.: 109. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado o porción de unión a antígeno del mismo, comprende dos dominios variables seleccionados del grupo que revelado anteriormente. Lo más preferido, el anticuerpo humanizado, o porción de unión a antígeno del mismo comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO.:67 & SEQ ID NO.:79, SEQ ID NO.:80 & SEQ ID NO.:81, SEQ ID NO.:82 & SEQ ID NO.:83, SEQ ID NO.:84 & SEQ ID NO.:85, SEQ ID NO.:86 & SEQ ID NO.:87, SEQ ID NO.:88 & SEQ ID NO.:89, SEQ ID NO.:90 & SEQ ID NO.:91, SEQ ID NO.:98 & SEQ ID NO.:99, SEQ ID NO.: 100 & SEQ ID NO.: 101, SEQ ID NO.: 102 & SEQ ID NO.: 103, SEQ ID NO.: 104 & SEQ ID NO.: 105, SEQ ID NO.: 106 & SEQ ID NO.: 107, y SEQ ID NO.: 108 & SEQ ID NO.: 109.

En una realización preferida, la proteína de unión revelada anteriormente comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de un dominio constante IgM humano, un

dominio constante IgG1 humano, un dominio constante IgG2 humano, un dominio constante IgG3 humano, un dominio constante IgG4 humano, un dominio constante IgE humano, y un dominio constante IgA humano. Más preferiblemente, la proteína de unión comprende SEQ ID NO.:2; SEQ DD NO.:3; SEQ ID NO.:4; y SEQ ID NO.:5.

La proteína de unión de la invención es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23. Preferiblemente, la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23. Más preferiblemente, la proteína de unión es capaz de neutralizar un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

En una realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad (asociación) (K_{on}) a IL-12 o IL-23 de al menos aproximadamente $10^2 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1} s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1} s^{-1}$; o al menos aproximadamente $10^6 M^{-1} s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad on (asociación) (K_{on}) a IL-12 o IL-23 entre $10^2 M^{-1} s^{-1}$ y $10^3 M^{-1} s^{-1}$; entre $10^3 M^{-1} s^{-1}$ y $10^4 M^{-1} s^{-1}$; entre $10^4 M^{-1} s^{-1}$ y $10^5 M^{-1} s^{-1}$; o entre $10^5 M^{-1} s^{-1}$ y $10^6 M^{-1} s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad off (disociación) (K_{off}) a IL-12 o IL-23 de máximo aproximadamente $10^{-3} s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-4} s^{-1}$; máximo aproximadamente $10^{-5} s^{-1}$; o máximo aproximadamente $10^{-6} s^{-1}$, medido por resonancia de plasmón superficial. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de velocidad off (disociación) (K_{off}) a IL-12 o IL-

23 de 10^{-3}s^{-1} a 10^{-4}s^{-1} ; de 10^{-4}s^{-1} a 10^{-5}s^{-1} ; o de 10^{-5}s^{-1} a 10^{-6}s^{-1} , medido por resonancia de plasmón superficial.

En otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a IL-12 o IL-23 de máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; o máximo 10^{-13} M. Preferiblemente, la proteína de unión de la invención tiene una constante de disociación (K_D) a IL-12 o IL-23 de 10^{-7} M a 10^{-8} M; de 10^{-8} M a 10^{-9} M; de 10^{-9} M a 10^{-10} M; de 10^{-10} a 10^{-11} M; de 10^{-11} M a 10^{-12} M; o de 10^{-12} a 10^{-13} M. Una realización de la invención provee una construcción de anticuerpo que comprende una cualquiera de las proteínas de unión reveladas anteriormente y un polipéptido enlazante o una inmunoglobulina. En una realización preferida la construcción de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, Fv unido a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio sencillo, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo dual específico, y un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida, la construcción de anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de un dominio constante de IgM humano, un dominio constante de IgG1 humano, un dominio constante de IgG2 humano, un dominio constante de IgG3 humano, un dominio constante de IgG4 humano, un dominio constante de IgE humano, y un dominio constante de IgA humano. Más preferiblemente, la construcción de anticuerpo comprende SEQ ID NO.:2; SEQ ID NO.:3; SEQ ID NO.:4; y SEQ ID NO.:5. En otra realización, la invención provee un conjugado de anticuerpo que comprende la construcción del anticuerpo revelada anteriormente y un agente seleccionado del grupo que consiste de; una molécula de inmunoadhesión, un agente de representación

gráfica, un agente terapéutico, y un agente citotóxico. En una realización preferida, el agente de representación gráfica es seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminescente, un marcador bioluminescente, un marcador magnético, y biotina. Más preferiblemente, el agente de representación gráfica es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm . En una realización preferida, el agente terapéutico o citotóxico es seleccionado del grupo que consiste de; un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

En otra realización, la construcción de anticuerpo está glicosilada. Preferiblemente, la glicosilación es un patrón de glicosilación humano.

En otra realización la proteína de unión, la construcción de anticuerpo o conjugado de anticuerpo revelado anteriormente existe como un cristal. Preferiblemente, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de vehículo. En una realización preferida, la proteína de unión cristalizada, la construcción de anticuerpo cristalizada o conjugado de anticuerpo cristalizado tiene una vida media in vivo mayor que su contraparte soluble. En otra realización preferida, la proteína de unión cristalizada, construcción de anticuerpo cristalizado o conjugado de anticuerpo cristalizado retiene la actividad biológica después de cristalización.

Un aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una cualquiera de la proteína de unión, construcción de anticuerpo o conjugado de anticuerpo revelado anteriormente. Una realización adicional provee un vector que comprende el ácido nucleico aislado revelado anteriormente, en donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste de

pcADN; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (pTT con sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17); pBV; pJV; y pBJ.

En otro aspecto, una célula hospedera es transformada con el vector revelado anteriormente. Preferiblemente, la célula hospedera es una célula procariótica. Más preferiblemente, la célula hospedera es E.Coli. En una realización relacionada, la célula hospedera es una célula eucariótica. Preferiblemente, la célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de célula protista, célula animal, célula de planta y célula fúngica. Más preferiblemente, la célula hospedera es una célula mamífera incluyendo, pero sin limitarse a, CHO y COS; o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto tal como Sf9.

Otro aspecto de la invención provee un método para producir una proteína de unión que se une a la subunidad p40 de IL-12, que comprende cultivar una cualquiera de las células hospederas reveladas anteriormente, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se une a la subunidad p40 de IL-12. Otra realización provee una proteína de unión producida de acuerdo con el método revelado anteriormente.

Una realización provee una composición para liberación de una proteína de unión en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, construcción de anticuerpo cristalizada o conjugado de anticuerpo cristalizado revelado anteriormente y un ingrediente; y al menos un vehículo polimérico. Preferiblemente, el vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(amino ácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli

(caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico – alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos. Preferiblemente, el ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietilen glicol.

Otra realización provee un método para tratar un mamífero que comprende el paso de tratar un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición revelada anteriormente.

La invención provee también una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, construcción de anticuerpo o conjugado de anticuerpo revelado anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de IL-12 y/o IL-23 es perjudicial. Preferiblemente, el agente adicional es seleccionado del grupo que consiste de: agente terapéutico, agente de representación gráfica, agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis (incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos anti-VEGF o VEGF-trap); inhibidores de quinasa (incluyendo, pero sin limitarse a inhibidores de KDR y TIE-2); bloqueadores de molécula de co-estimulación (incluyendo, pero sin limitarse a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20); bloqueadores de molécula de adhesión (incluyendo, pero sin limitarse a anti-LFA-1 Abs, anti-E/L selectina Abs, inhibidores de molécula pequeña); anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos

anti-IL-18, anti-TNF, anti-IL-6/receptor de citoquina); metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcador o reportero detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anesésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un antagonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

En otro aspecto, la invención provee un método para inhibir la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana, que comprende contactar la IL-12 humana y/o IL-23 humana con una proteína de unión revelada anteriormente, de forma que la actividad de la IL-12 humana y/o IL-23 humana es inhibida. En un aspecto relacionado la invención provee un método para inhibir la actividad de la IL-12 humana y/o IL-23 humana en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de IL-12 y/o IL-23 es perjudicial, que comprende administrar al sujeto humano una proteína de unión revelada anteriormente de forma que la actividad de la IL-12 humana y/o IL-23 humana en el sujeto humano es inhibida y se logra el tratamiento. Preferiblemente, el trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis soriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto hospedero, rechazo de transplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con transplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación

intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignancias, falla cardíaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de distrés respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía soriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada con yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollar autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovárica, falla ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad

pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a la insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con transplante de órgano, enfermedad inmune crónica asociada con transplante de órgano, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, soriasis tipo 1, soriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritides, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de la esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipertiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda vitiligo, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrásica, hepatitis inducida por Fármaco, Esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección estreptocócica del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.e., depresión y

esquizofrenia), enfermedades mediadas Tipo Th1 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal, y malignancias hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, falla renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de célula del cuerno anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxismal), aleteo auricular, bloqueo atrioventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de transplante de médula espinal (BMT), bloqueo de ramas de fascículo, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por bypass cardiopulmonar, rechazo de transplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, falla cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con la terapia de citoquina, Demencia pugilística, enfermedades de desmielinación, fiebre de dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus,

enfermedad aterosclerótica diabética, Enfermedad con cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, Síndrome de Down en la madurez, trastornos de movimiento inducidos por fármaco, inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eccema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de célula vellosa, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias His de fascículo, neuropatía por infección de VIH/VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinéticos, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis de hipersensibilidad, hipertensión, trastorno de movimientos hipocinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, ataque isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de transplante de tumor, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de transplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, dolores de cabeza migrañosos, trastornos del multi sistema mitocondrial, enfermedad de tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas

múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, micobacteria aviar intracelular, tuberculosis por micobacteria, síndrome mielodisplásico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma diferente de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia con okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo de transplante de paratiroide, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardica, enfermedad aterlosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome post perfusión, síndrome post bombeo, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, Parálisis Supranuclear Progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia con QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil del tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de célula de hoz, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, célula T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de

hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico viral asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido.

En otro aspecto la invención provee un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual la IL-12 humana y/o IL-23 humana es perjudicial, que comprende el paso de administrar una cualquiera de las proteínas de unión reveladas anteriormente, concurrente, o después de la administración de un segundo agente, como se discutió anteriormente. En una realización preferida, el segundo agente es seleccionado del grupo que consiste de budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de señalización de célula T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles,

receptor de TNF p55 soluble, receptor TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β . En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas reveladas anteriormente son administradas al sujeto mediante al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, 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.

Un aspecto de la invención provee al menos un anticuerpo anti-idiotipo IL-12 a al menos una proteína de unión de IL-12 de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una porción de una molécula de una inmunoglobulina tal como, pero sin limitarse a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o liviana 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 marco, o; cualquier porción de los mismos, que puede ser incorporada en una proteína de unión de la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

Esta invención se refiere a proteínas de unión a IL-12p40, particularmente anticuerpos anti-IL-12p40, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-12p40. Varios aspectos de la invención se relacionan con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, y composiciones

farmacéuticas de los mismos, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células hospederas para preparar tales anticuerpos y fragmentos. Métodos para usar los anticuerpos de la invención para detectar IL-12p40 humana, IL-12 humana e IL-23 humana; para inhibir la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana, ya sea in vitro o in vivo; y para regular la expresión del gen, también están abarcados por la invención.

A menos que se defina de otra forma en la presente, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados entendidos comúnmente por los expertos en la técnica. El significado y alcance de los términos debe ser claro, sin embargo, en el caso de ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas aquí serán precedentes sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Adicionalmente, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se declare de otra forma. Adicionalmente, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarca tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se declare específicamente de otra forma.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en connexion con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, química e hibridación de proteína y ácido nucleico descritas aquí son aquellas conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas por

la presente descripción a menos que se indique de otra forma. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe aquí. La nomenclatura usada en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos aquí son aquellos bien conocidos y usados comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis convencionales, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y liberación, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda ser más fácilmente entendida, los términos seleccionados se definen a continuación.

El término "Polipéptido" como se usa aquí, se refiere a cualquier cadena polimérica de amino ácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan intercambiablemente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de amino ácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación, no está asociado con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo; es sustancialmente libre de otras proteínas de las mismas especies; está expresado por una célula de especies diferentes; o no se encuentra en la naturaleza. Así, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular de la célula de la cual se origina será "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también puede hacerse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante

así mismo, usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "recuperación" como se usa aquí, se refiere al proceso de hacer una especie química, tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento, p.e., usando técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica.

El término "IL-12 humana" (abreviada aquí como hIL-12, o IL-12), como se usa aquí, incluye una citoquina humana que es secretada principalmente por células que presentan antígeno tales como monocitos macrófagos y células dendríticas. El término incluye una proteína heterodimérica que comprende una subunidad de 35 kD (p35) y una subunidad de 40 kD (p40) que están unidas con un puente de disulfuro. La proteína heterodimérica es referida como una "proteína p70". La estructura de la IL-12 humana está descrita adicionalmente en, por ejemplo, Kobayashi, *et al.* (1989) *J. Exp Med.* 170:827- 845; Seder, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10188-10192; Ling, *et al.* (1995) *J. Exp Med.* 154: 116-127; Podlaski, *et al.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294:230-237. El término IL-12 humana pretende incluir IL-12 humana recombinante (rh IL-12), que puede prepararse mediante métodos de expresión recombinante estándar.

El término "IL-23 humana" (abreviada aquí como hIL-23, o IL-23), como se usa aquí, incluye una citoquina humana heterodimérica que pertenece a una familia de cinco citoquinas heterodiméricas que incluyen IL-12 e IL-27 (Trinchieri *et al.*, (2003) *Immunity* 19:641-644). El término incluye una proteína heterodimérica que comprende una subunidad de 19 kD (p19) y una subunidad de 40 kD (p40) que están unidas con un puente de disulfuro. El término IL-23 humana pretende incluir IL-23 humana recombinante (rh IL-23), que puede prepararse mediante métodos de expresión recombinante estándar.

54 45
SA

El término "IL-12p40", idéntico a "IL-23p40", y también referido como simplemente "p40", como se usa aquí, incluye la subunidad de 40 kD de la citoquina humana IL-12 (p40) y la subunidad de 40 kD de la citoquina humana IL-23. La Tabla 1 muestra la secuencia de amino ácido de IL-12p40, SEQ ID No. 1, que es conocida en la técnica.

Tabla 1: Secuencia de la subunidad p40 de IL-12 e IL-23

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Subunidad p40 de IL-12 e IL-23	SEQ ID NO.: 1	MCHQQLVISWFSLVFLDLVAIWELKKDVYVVE LDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVF TDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW ASVPCS

"Actividad biológica" como se usa aquí, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de la citoquina. Las propiedades biológicas de IL-12 incluyen, pero no se limitan al unión al receptor de IL-12; inducción de la secreción de (IFN- γ) y regulación de balance entre antígeno-linfocitos de célula T colaboradora tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) específica. Las propiedades biológicas de IL-23 incluyen, pero no se limitan a unión al receptor de IL-23, incluyendo inducción de la producción de IFN- γ , diferenciación de célula Th1 y activación de las funciones que presentan antígeno de células dendríticas, e inducir selectivamente la proliferación de células T de la memoria.

Los términos "unión específica" o "que se une específicamente", como se usan aquí, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significan que la interaccion es

dependiente de la presencia de una estructura particular (p.e., un determinante antigénico o epítopo) en las especies químicas; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de otras proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para el epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, ampliamente se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación de las mismas, que retiene las características de unión a epítopo esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpo mutantes, variantes, o derivados son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de estos se discuten más adelante.

En un anticuerpo de longitud total, cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de uno dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden estar además subdivididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), interespaciadas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, distribuidas desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo

47
59
61

(p.e., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p.e., IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la habilidad para unirse específicamente a un antígeno (p.e., hIL-12). It Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Tales realizaciones de anticuerpo también pueden ser formatos biespecíficos, duales específicos, o multi-específicos; que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 Todas incorporadas aquí por referencia), que comprende un dominio variable sencillo; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que permite que se hagan como una cadena de proteína sencilla en la cual el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver p.e., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también pretenden estar abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos

de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL están expresados en una cadena de polipéptido sencilla, pero usando un enlazante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver p.e., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Tales porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "construcción de anticuerpo" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención unidas a un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazantes comprenden dos o más residuos de amino ácido unidos por enlaces de péptido y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos enlazantes son bien conocidos en la técnica (ver p.e., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de amino ácido de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de IgG humana son conocidas en la técnica y están representadas en la Tabla 2.

61
63

Tabla 2: Secuencia de dominio constante de cadena pesada y dominio constante de cadena ligera de IgG humana

Proteína	Identificador de Secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante gamma-1 Ig	SEQ ID NO.: 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Mutante de Región constante gamma-1 Ig	SEQ ID NO.: 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Región constante kappa Ig	SEQ ID NO.: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Región constante lambda Ig	SEQ ID NO.: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Aún adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de

anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de reacción de núcleo de estreptavidina para preparar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de los anticuerpos enteros. Más aún, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante estándar, como se describen aquí.

Un "anticuerpo aislado", como se usa aquí, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades de antígeno diferentes (p.e., un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-12 es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de hIL-12). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-12 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-12 de otras especies. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de material celular y/o químicos.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de amino ácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p.e., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por

51
62
65

mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa aquí, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tal como ratón, han sido injertadas en secuencias de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera (mejor descrita en la Section II C, de más adelante), anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpo humano combinatorial, recombinante (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371- 378), anticuerpos aislados de un animal (p.e., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver p.e., Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucra corte y empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagenesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por ende, las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque son derivadas de y están relacionadas con las secuencias VH y VL de

línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal humana in vivo.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas enlazadas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo de CRD injertada" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y variable de una especie pero en las cuales las secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL son reemplazadas con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las cuales una o más de las CDRs murinas (p.e., CDR3) ha sido reemplazada con secuencias CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (p.e., un ratón) pero en la cual al menos una porción de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para ser más "tipo humana", p.e., más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con CDR injertada, en el cual las secuencias de CDR humanas son introducidas en las secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias de CDR no humanas correspondientes.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat" y "marcado Kabat" se usan aquí intercambiabilmente. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos

58
65
67

de amino ácido que son más variables (p.e. hipervariablee) que otros residuos de amino ácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 y, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 31 a 35 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 65 para CDR2, y posiciones de amino ácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de amino ácido 24 a 34 para CDR1, posiciones de amino ácido 50 a 56 para CDR2, y posiciones de amino ácido 89 a 97 para CDR3.

Como se usan aquí, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de amino ácido de una o más de las regiones marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de amino ácido o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica la(s) región(es) constante(s). En ya otra realización, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de amino ácido o ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y la(s) región(es) constante(s). En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de amino ácido o ácido nucleico de anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de amino ácido de una o más de las regiones marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de amino ácido que no se encuentra en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco de aceptor y/o

54
66
68

región(es) constante(s) de aceptor puede ser, p.e., derivada u obtenida de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (p.e., anticuerpos bien concodiso en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se usa aquí, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables del anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que son designadas como CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR", como se usa aquí, se refiere a un grupo de las tres CDRs que se encuentran en una región variable sencilla capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidos en forma diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo provee un sistema de numeración de residuos no ambiguo applicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites de residuo precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como CDRs Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs Kabat adoptan conformaciones de estructura de péptido casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad en el nivel de secuencia de amino ácido. Estas sub-porciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como la CDRs Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDRs Kabat. Otros límites que definen la superposición de CDRs con las CDRs Kabat han sido descritas por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de

los sistemas anteriores, pero sin embargo, se superpondrán con las CDRs Kabat, aunque pueden ser acortadas o alargadas a la luz de la predicción o hallazgos experimentados que residuos o grupos particulares de residuos o incluso CDRs enteras no impactan significativamente en la unión a antígeno. Los métodos usados aquí pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con uno cualquiera de estos sistemas, aunque realizaciones preferidas usan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa aquí, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica definida por Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), ambas incorporadas aquí por referencia). De acuerdo con Chothia et al., las porciones críticas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen conformaciones de estructura de péptido casi idénticas a pesar de la gran diversidad en el nivel de secuencia de amino ácido. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la estructura de péptido para un segmento contiguo de residuos de amino ácido que forman una asa.

Como se usa aquí, los términos "donador" y "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo que proporciona una o más CDRs. En una realización preferida, el anticuerpo donador es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del cual se obtiene o derivan las regiones marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDRs.

Como se usa aquí, el término "marco" o "secuencia marco" se refiere a el resto de las secuencias de una región variable menos las CDRs. Como la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse por diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sometida a diferentes

56
68
20

interpretaciones de forma correspondiente. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las cuales la CDR1 está posicionada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como la refieren otros, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una cadena sencilla de inmunoglobulina que se encuentra naturalmente. Como se usa aquí, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FRs representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región marco.

Las secuencias de acceptor de cadena pesada y cadena ligera humanas son conocidas en la técnica. En una realización de la invención, las secuencias de acceptor de cadena pesada y cadena ligera humanas se seleccionan de las secuencias descritas en la Tabla 3 y Tabla 4.

TABLA 3: SECUENCIAS DE ACEPTOR DE CADENA PESADA

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
6	FR1 VH2-70/JH6	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
7	FR2 VH2-70/JH6	WIRQPPGKALEWLA
8	FR3 VH2-70/JH6	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
9	FR4 VH2-70/JH6	WGQGTTVTVSS
10	FR1 VH2-26/JH6	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
7	FR2 VH2-26/JH6	WIRQPPGKALEWLA
11	FR3 VH2-26/JH6	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
9	FR4 VH2-26/JH6	WGQGTTVTVSS
12	FR1 VH3-72/JH6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
13	FR2 VH3-72/JH6	WVRQAPGKGLEWVG
14	FR3 VH3-72/JH6	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
9	FR4 VH3-72/JH6	WGQGTTVTVSS

52
64
71

15	FR1 VH3-21/JH6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
16	FR2 VH3-21/JH6	WVRQAPGKGLEWVS
17	FR3 VH3-21/JH6	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
9	FR4 VH3-21/JH6	WGQGTTVTVSS
18	FR1 VH1-69/JH6	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
19	FR2 VH1-69/JH6	WVRQAPGQGLEWMG
20	FR3 VH1-69/JH6	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
9	FR4 VH1-69/JH6	WGQGTTVTVSS
21	FR1 VH1-18/JH6	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
19	FR2 VH1-18/JH6	WVRQAPGQGLEWMG
22	FR3 VH1-18/JH6	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	FR4 VH1-18/JH6	WGQGTTVTVSS

TABLA 4: SECUENCIAS DE ACEPTOR DE CADENA LIGERA

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
23	FR1 B3/JK4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
24	FR2 B3/JK4	WYQQKPGQPPLLIY
25	FR3 B3/JK4	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
26	FR4 B3/JK4	FGGGTKVEIKR
27	FR1 L2/JK4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
28	FR2 L2/JK4	WYQQKPGQAPRLLIY
29	FR3 L2/JK4	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
26	FR4 L2/JK4	FGGGTKVEIKR
30	FR1 L15/JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
31	FR2 L15/JK4	WYQQKPEKAPKSLIY
32	FR3 L15/JK4	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	FR4 L15/JK4	FGGGTKVEIKR
33	FR1 L5/JK4	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
34	FR2 L5/JK4	WYQOKPGKAPKLLIY
32	FR3 L5/JK4	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
26	FR4 L5/JK4	FGGGTKVEIKR

Como se usa aquí, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que

58
72

conduce al reordenamiento genético y mutación para expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, p.e., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por varias realizaciones de la presente invención proviene del reconocimiento que es más probable que los genes de anticuerpo de línea germinal conserven las estructuras de secuencia de amino ácido esenciales características de individuos en la especie, que los genes de anticuerpo maduro, por ende, menos probable que sean reconocidos como de una fuente extraña cuando se usan terapéuticamente en esa especie.

Como se usa aquí, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más impacto en la especificidad y/o afinidad de enlace de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: un residuo que está adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser sitio cualquiera de N- u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier, y un residuo en la región que se superpone entre la definición Chothia de una cadena pesada variable CDR1 y la definición Kabat del primer marco de cadena pesada.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o un variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés, y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de amino ácido de un anticuerpo no humano. Como se usa aquí, el término "sustancialmente" en el contexto de una

CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de amino ácido de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (p.e., anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de oconcenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado también puede ser seleccionado de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG 1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares se pueden seleccionar para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesita corresponder precisamente a las secuencias base, p.e., la CDR del anticuerpo

donador o el marco de concenso puede ser mutagenizado mediante sustitución, inserción y/o eliminación de al menos un residuo de amino ácido de forma que el residuo de CDR o marco en ese sitio no corresponde ni al anticuerpo donador ni al marco de concenso. En una realización preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Usualmente, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferido al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de FR y CDR base. Como se usa aquí, el término "marco de concenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulina de concenso. Como se usa aquí, el término "secuencia de inmunoglobulina de concenso" se refiere a la secuencia formada a partir de amino ácidos que se encuentran más frecuentemente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (Ver p.e., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de concenso está ocupada por el amino ácido que se encuentra más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos amino ácidos se encuentran igualmente frecuentes, cualquiera puede ser incluido en la secuencia de concenso.

Como se usa aquí, la zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos de marco que pueden ajustarse a la estructura de la CDR y refina el ajuste al antígeno como lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que están incorporada aquí por referencia). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que subyace las CDRs y puede impactar en la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

Como se usa aquí, el término "neutralización" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una citoquina cuando una proteína de unión se une específicamente a la citoquina. Preferiblemente, una proteína de unión neutralizante es un anticuerpo neutralizante cuya unión a hIL-12 y/o

hIL-23 produce la inhibición de una actividad biológica de hIL-12 y/o hIL-23. Preferiblemente, la proteína de unión neutralizante se une a hIL-12 y/o hIL-23 y reduce una actividad biológica de IL-12 y/o hIL-23 en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La inhibición de una actividad biológica de hIL-12 y/o hIL-23 por una proteína de unión neutralizante puede ser evaluada midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de hIL-12 y/o hIL-23 bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la proliferación de blasto humano en fitohemaglutinina en un Ensayo de Inducción de Interferon-gamma de blasto de PHA (ver Ejemplo 1.1.C) o la inhibición de unión de receptor en un ensayo de unión de receptor IL-12 humano, (ver también Salfeld et al., Publicación PCT No.WO 00/56772 A1).

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de enlace de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 que se une a un antígeno IL-12 y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 cuya unión a hIL-12 inhibe la actividad biológica de hIL-12, p.e., inhibición de la proliferación de blasto de PHA o inhibición de unión de receptor en un ensayo de unión de receptor a IL-12 humana, Ensayo de Inducción de Interferon-gamma de blasto de PHA (ver Ejemplo 1.1.C).

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T. En ciertas realizaciones, los determinantes epítipo incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como amino ácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener tres características estructurales dimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une

específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones de las concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden y Piscataway, NJ). Para mayores descripciones, ver Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al (1995) *J. Mol Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término " K_{on} ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad encendida on para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " K_{off} ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de velocidad apagada off para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " K_d ", como se usa aquí, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

El término "proteína de unión marcada" como se usa aquí, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que provee la identificación de la proteína de unión. Preferiblemente, el marcador es un marcador detectable, p.e., la incorporación de un amino ácido radiomarcado o unión a un polipéptido de mitades biotiniladas que pueden ser detectadas por avidina marcada (p.e.,

estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p.e., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (p.e., FTTC, rodamina, lantanida fosfores), marcadores enzimáticos (p.e., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos biotínico; epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (p.e., secuencias de par cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como anticuerpo, químicamente unido a una segunda mitad química, tal como un terapéutico o agente citotóxico. El término "agente" se usa aquí para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto preparado de materiales biológicos. Preferiblemente, los terapéuticos o agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los términos "cristal", y "cristalizado" como se usan aquí, se refieren a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de arreglos de átomos,

iones, moléculas regulares, repetitivos, tridimensionales (p.e., proteínas tales como anticuerpos), o ensambles moleculares (p.e., complejos antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales están distribuidos de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que es repetida en un cristal es llamada la unidad asimétrica. La repetición de una unidad asimétrica en un arreglo que se conforma en una simetría cristalográfica dada bien definida provee la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por translaciones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Ver Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

El término "polinucleótido" como se refiere aquí significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o deoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN pero preferiblemente es ADN bicatenario.

El término "polinucleótido aislado" como se usa aquí significará un polinucleótido (p.e., de genómico, cADN, u origen sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no se encuentra en la naturaleza como una parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se usa aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido unida. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una asa de AND

79/65
2/4

bicatenario circular en la cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la cual son introducidos (p.e., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (p.e., vectores mamíferos no episomales) pueden ser integrados en el genoma de una célula hospedera a la introducción en la célula hospedera, y de esta forma son replicados junto con el genoma hospedero. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están operativamente unidos. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están usualmente en la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiablemente porque el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p.e., retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados defectuosos en replicación), que sirven funciones equivalentes.

El término "unido operativamente" se refiere a una juxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera destinada. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia de codificación está ligada de forma que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de expresión que están contiguas con el gen de interés y secuencias de control expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" como se usa aquí se refiere a secuencias

de polinucleótido que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias de codificación a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación de transcripción, terminación, promotor y potenciador; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan mARN citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de translación (p.e., secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de la proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedero; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencia de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

"Transformación", como se usa aquí, se refiere a cualquier proceso mediante el cual el ADN exógeno entra en una célula hospedera. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación se puede basar en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula hospedera procariótica o eucariótica. El método se selecciona con base en la célula hospedera que está siendo transformada y puede incluir, pero sin limitarse a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partícula. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas establemente en las cuales el ADN es capaz de replicación ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma hospedero. También incluyen células

que expresan tempralmente el ADN o ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedera recombinante " (o simplemente "célula hospedera"), como se usa aquí, pretende referirse a una célula en la cual se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que tales términos pretenden referirse no solamente a la célula sujeto particular, sino, a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula base, pero están aún incluidas dentro del alcance del término "célula hospedera" como se usa aquí. Preferiblemente, las células hospederas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de vida de la naturaleza. Las células eucarióticas preferidas incluyen células de protistos, fúngicas, de plantas y animales. Las células hospederas más preferidas incluyen, pero no se limitan a la línea celular procariótica E.Coli; líneas celulares mamíferas CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo de tejido y transformación (p.e., electroporación, lipofección). Las técnicas de reacción enzimáticas y de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se realizan en la técnica o se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden generalmente realizarse de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente descripción. Ver p.e., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que está incorporada aquí por referencia para cualquier propósito.

"Organismo transgénico", como se conoce en la técnica, y como se usa aquí, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgen, en donde el transgen introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN, que está establemente y operativamente integrada en el genoma de una célula en la cual se desarrolla un organismo transgénico, dirigiendo la expresión de un producto de gen codificado en uno o más tipos de célula o tejidos del organismo transgénico.

El término "regular" y "modular" se usan intercambiabilmente, and, como se usa aquí, se refieren a una alteración de la actividad de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de hIL-12). La modulación puede ser un aumento o una disminución de la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular, y transducción de señal.

En correspondencia, el término "modulador", como se usa aquí, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p.e., la actividad biológica de hIL-12). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución de la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula, comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Inhibidores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los péptidos se describen, p.e., en WO01/83525.

El término "agonista", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando se contacta con una molécula de interés, causa un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del agonista. Agonistas de interés particulares pueden incluir, pero no limitarse a, polipéptidos de IL-12 o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula que se une a hIL-12.

El término "antagonista" o "inhibidor", como se usa aquí, se refiere a un modulador que, cuando es contactado con una molécula de interés causa una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula comparada con la magnitud de la actividad o función observada en la ausencia del antagonista. Antagonistas de interés particulares incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hIL-12 y/o hIL-23. Los antagonistas e inhibidores de IL-12 y/o IL-23 pueden incluir, pero no limitarse a, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o cualquier otra molécula, que se une a hIL-12 y/o hIL-23.

Como se usa aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, evitar el avance de un trastorno, causar regresión de un trastorno, evitar la recurrencia, desarrollo, aparición o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia (p.e., agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", como se usa aquí, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se usa aquí, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una cosa viviente o inicialmente cosa viviente. Tales cosas vivientes incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, ratas, micos,

perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula espinal, ganglios linfáticos y bazo.

I. Anticuerpos que se Unen a IL-12p40 Humana.

Un aspecto de la presente invención provee anticuerpos monoclonales murinos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-12p40 con afinidad alta, una velocidad lenta y alta capacidad de neutralización. Un segundo aspecto de la invención provee anticuerpos quiméricos que se unen a IL-12p40. Un tercer aspecto de la invención provee anticuerpos con CDR injertada, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-12p40. Un cuarto aspecto de la invención provee anticuerpos humanizados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-12p40. Preferiblemente, los anticuerpos, o porciones de los mismos, son anticuerpos aislados. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos neutralizantes anti-IL-12 humana y/o anti-IL-23 humana.

A. Método para preparar anticuerpos anti-IL-12p40

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por cualquiera de un número de técnicas conocidas en la técnica.

1. Anticuerpos anti-IL-12 p40 monoclonales usando tecnología de Hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y despliegue del fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se

pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (dichas referencias incorporadas por referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que es derivado de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico, o de fago, y no el método por el cual este es producido.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son de rutina y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente invención provee métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, en donde, preferiblemente, el hibridoma es generado fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma, y luego seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención (Ver Ejemplo 1.2). Brevemente, los ratones pueden ser inmunizados con un antígeno de IL-12. En una realización preferida, el antígeno de IL-12 es administrado con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido de la rápida dispersión secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan el hospedero para secretar factores que son quimiotácticos o macrófagos, y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se está administrando un polipéptido, el programa de

inmunización involucrará dos o más administraciones del polipéptido, propagadas por varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno de IL-12, se puede obtener del animal anticuerpos y/o células que producen anticuerpo. Se obtiene del animal un suero que contiene un anticuerpo anti-IL-12 mediante sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede usar como se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina a partir del suero, o los anticuerpos anti-IL-12 pueden ser purificados del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, teniendo así un ordenamiento heterogéneo de propiedades.

Una vez se detecta una respuesta inmune, p.e., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno de IL-12 en el suero del ratón, el bazo del ratón es cosechado y los esplenocitos son aislados. Los esplenocitos son entonces fusionados mediante técnicas bien conocidas, a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible del ATCC. Los hibridomas son seleccionados y clonados por dilución limitada. Los clones de hibridoma son entonces ensayados por métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a IL-12. Se puede generar fluido Ascitis, que contiene generalmente niveles altos de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpo pueden ser preparados de animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal es sacrificado y las células B esplénicas son fusionadas a células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Ver, p.e., Harlow y Lane, supra. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y selección antibiótica, los

33
38
8X

hibridomas son seleccionados usando IL-12, o una porción de la misma, o una célula que expresa IL-12. En una realización preferida, la selección inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente una ELISA. Un ejemplo de selección de ELISA se provee en WO 00/37504, incorporada aquí por referencia.

Los hibridomas que producen anticuerpo anti-IL-12p40 se seleccionan, clonan y detectan adicionalmente para características deseables, incluyen crecimiento de hibridoma robusto, alta producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables, como se discute mejor más adelante. Los hibridomas pueden ser cultivados y expandidos *in vivo* en animales singenéticos, en animales que carecen de un sistema inmune, p.e., ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas son producidas en una especie no humana, de no ratón tales como ratas, oveja, cerdos, cabras, ganado o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los cuales un mieloma no secretor humano es fusionado con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-IL-12.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden ser producidos por clivado proteolítico de las moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

2. Anticuerpos monoclonales anti-IL-12p40 usando SLAM

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos recombinantes son generados a partir de linfocitos aislados sencillos usando un procedimiento referido en la técnica como el método de anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM), como se describe en la Patente U.S. No. 5,627,052, Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, las células sencillas que secretan anticuerpos de interés, p.e., linfocitos derivados de uno cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, son seleccionados usando un ensayo de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno de IL-12, una subunidad de IL-12, o un fragmento de la misma, es acoplado a células de glóbulos rojos de oveja usando un enlazante, tal como biotina, y se usan para identificar células sencillas que secretan anticuerpos con especificidad para IL-12. Después de la identificación de las células de interés que secretan anticuerpo, los cADN de región variable de cadena pesada y ligera son rescatados de las células mediante PCR de transcriptasa reversa y estas regiones variables pueden entonces ser expresadas, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (p.e., regiones constantes humanas), en células hospederas mamíferas, tales como células COS o CHO. Las células hospederas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de los linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden entonces someterse a análisis adicional y selección *in vitro*, por ejemplo mediante filtración de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos a IL-12. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden además ser manipuladas *in vitro*, tal como mediante métodos de maduración de afinidad *in vitro* tales como los descritos en la Publicación PCT WO 97/29131 y Publicación PCT WO 00/56772.

3. Anticuerpos monoclonales Anti-IL-12p40 usando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos son producidos inmunizando un animal no humano que comprende algo o todos los puntos de inmunoglobulina humana con un antígeno de IL-12. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón diseñada que comprende grandes fragmentos de los puntos de inmunoglobulina humana, y es deficiente en la producción de anticuerpo de ratón. Ver, p.e., Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) y Las Patentes de Estados Unidos 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 y 6,130,364. Ver también WO 91/10741, publicada el 25 de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre de 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 0009560, publicada el 24 de Febrero de 2000 y WO 00/037504, publicada el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera Mabs humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal de tamaño megabase de los puntos de cadena pesada humana y x puntos de cadena ligera. Ver Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), cuyas revelaciones están incorporadas aquí por referencia.

4. Anticuerpos monoclonales anti-IL-12 usando genotecas de anticuerpo recombinante

También se pueden usar métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, en donde una genoteca de anticuerpo es seleccionada para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de enlace deseada. Los métodos para tal selección de genotecas de anticuerpo recombinante son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente U.S. No. 5,223,409; Kang *et al.* Publicación PCT No. WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación PCT No. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hyhridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *JMol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, Publicación de solicitud de Patente US 20030186374, y Publicación PCT No. WO 97/29131, cuyos contenidos de cada una están incorporados aquí por referencia.

La genoteca de anticuerpo recombinante puede ser de un sujeto inmunizado con IL-12 o IL-23, o una porción de IL-12 o IL-23. Alternativamente, la genoteca de anticuerpo recombinante puede ser de un sujeto nativo, p.e., uno que no ha sido inmunizado con IL-12 o IL-23, tal como una genoteca de anticuerpo humano de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con IL-12 o IL-23 humana. Los anticuerpos de la invención son seleccionados mediante selección la genoteca de anticuerpo recombinante con el péptido que

37
91

comprende IL-12p40 humana para seleccionar de esta forma aquellos anticuerpos que reconocen IL-12p40. Los métodos para conducir tal detección y selección son bien conocidos en la técnica, tales como se describen en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de enlace particulares para hIL-12, tales como las que se disocian de la IL-12 humana con una constante de velocidad k_{off} particular, se puede usar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar los anticuerpos que tienen la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante particular para IL-12, tal como aquellos con un IC_{50} particular, se pueden usar los métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hIL-12.

En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a IL-12 humana y/o IL-23 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En varias realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden ser generados usando varios métodos de despliegue del fago conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue del fago, los dominios de anticuerpo funcionales son mostrados sobre la superficie de partículas del fago que portan las secuencias de polinucleótido que los codifican. En particular, el fago puede ser utilizado para mostrar dominios de unión a antígeno expresados de un repertorio o genoteca de anticuerpo combinacional (p.e., humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con antígeno, p.e., usando antígeno marcado o antígeno enlazado o capturado en una superficie sólida o lecho. El fago usado en estos métodos es típicamente fago filamentoso

78
90 92

incluyendo los dominios de unión fd y M13 expresados del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados recombinantemente al gen III de fago o proteína VIII del gen. Ejemplos de métodos de despliegue del fago que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Pat. U.S. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108; cada uno de los cuales está incorporado aquí por referencia en su totalidad.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones que codifican el anticuerpo desde el fago pueden ser aisladas y usadas para generar anticuerpos enteros incluyendo anticuerpos humanos o cualquier fragmento de unión a antígeno deseado, y expresados en cualquier hospedero deseado, incluyendo células mamíferas, células de insecto, células de planta, levadura, y bacterias, p.e., como se describe en detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los revelados en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6): 864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); y Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (dichas referencias incorporadas por referencia en su totalidad). Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen aquellas descritas en la Pat. U.S. 4,946,778 y 5,258, 498; Huston et

al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Alternas a la selección de genotecas de anticuerpo recombinante mediante despliegue del fago, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para seleccionar genotecas combinacionales grandes para la identificación de anticuerpos de especificidad dual de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el cual la genoteca de anticuerpo recombinante es expresada como fusiones de ARN-proteína, como se describe en la Publicación PCT No. WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un mARN y el péptido o proteína que lo codifica mediante translación *in vitro* de mARNs sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en sus extremos 3'. Así, un mARN específico puede ser enriquecido de una mezcla compleja de mARNs (p.e., una genoteca combinacional) con base en las propiedades del péptido o proteína codificada, p.e., anticuerpo, o porción del mismo, tal como unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas de la selección de tales genotecas pueden ser expresadas por medios recombinantes como se describiorn anteriormente (p.e., en células hospederas mamíferas) y, más aún, pueden ser sometidas a maduración de afinidad adicional por rondas adicionales de selección de fusiones mARN-péptido en las cuales las mutaciones han sido introducidas en la(s) secuencia(s) seleccionada(s) originalmente, o mediante otros métodos para maduración de afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió anteriormente.

En otro criterio, los anticuerpos de la presente invención también pueden ser generados usando métodos de despliegue de levadura conocidos en la

92/80
94

técnica. En los métodos de despliegue de levadura, se usan métodos genéticos para atar dominios de anticuerpo a la célula de levadura y mostrarlas en la superficie de la levadura. En particular, tal levadura se puede utilizar para mostrar dominios de unión a antígeno expresados de un repertorio o genoteca de anticuerpo combinacional (p.e., humana o murina). Ejemplos de métodos de despliegue de levadura que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos revelados en Wittrup, et al. Patente U.S. No. 6,699,658 incorporada aquí por referencia.

B. Producción de anticuerpos IL-12p40 recombinantes

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser producidos por cualquiera de un número de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión desde células hospederas, en donde el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera es (son) transfectado(s) en una célula hospedera mediante técnicas estándar. Se pretende que las varias formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedera procariótica o eucariótica, p.e., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospederas procarióticas o eucarióticas, se prefiere la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y lo más preferido en células hospederas mamíferas, debido a que es más posible que tales células eucarióticas (y en particular células mamíferas) se ensamblen y secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo que las células procarióticas.

Las células hospederas mamíferas preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y

81
9345

Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, p.e., como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpo son introducidos en células hospederas mamíferas, los anticuerpos son introducidos cultivando las células hospederas por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células hospederas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteína estándar.

También se pueden usar células hospederas para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedera con fragmentos funcionales que codifican ADN de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. También se puede usar tecnología de ADN recombinante para remover algo o todo el ADN que codifica cualquiera o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas desde tales moléculas de ADN truncado también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Adicionalmente, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los cuales una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno diferente de los antígenos de interés por entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención a un segundo anticuerpo mediante métodos de entrecruzamiento químico estándar.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada de anticuerpo y la cadena ligera de anticuerpo, es introducido en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno unidos operativamente a elementos reguladores potenciadores de CMV/promotores de AdMLP para impulsar niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas son cultivadas para permitir la expresión de las cadenas de cadena pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto es recuperado del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándar se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospederas, seleccionar transformantes, cultivar las células hospederas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Aún adicionalmente, la invención provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula hospedera de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede además comprender aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

1. Anticuerpos anti-IL-12p40

La Tabla 5 es una lista de secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-hIL-12p40 preferidos de la invención.

97-83
as

Tabla 5: Lista de Secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL

SEQ ID No.	Región de Proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
35	VH 1D4		QVTLKESGPGILQPSQTL SL TCSFSGFSLR KSVMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTA DAATYYCTRRGIRSAMDYWGQGTSVTVSS
	CDR-H1 VH 1D4	Residuos 31-37 de SEQ ID NO. 35	KSVMGVS
	CDR-H2 VH 1D4	Residuos 52-67 de SEQ ID NO. 35	HIYWDDDKYYNPSLKS
	CDR-H3 VH 1D4	Residuos 100-108 de SEQ ID NO. 35	RGIRSAMDY
36	VL 1D4		SVVMTQTPKFLLVSAGDRVTTITCKASQSVS NDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFIISTVRAEDLAVYFCQQ DYNSPWTFGGGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 1D4	Residuos 24-34 de SEQ ID NO. 36	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 1D4	Residuos 50-56 de SEQ ID NO. 36	YASNRYT
	CDR-L3 VH 1D4	Residuos 89-97 de SEQ ID NO. 36	QQDYNSPWT
37	VH 1A6		QVTLKESGPGILKPSQTL SL TCSFSGFSL S TSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLRIATVDTA DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTSVTVSS
	CDR-H1 VH	Residuos 31-	

98 84
96

	1A6	37 de SEQ ID NO. 37	TSGMGVS
	CDR-H2 VH 1A6	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO. 37	HIWWDGDNYYNPSLKS
	CDR-H3 VH 1A6	Residuos 100-109 de SEQ ID NO. 37	RTRVNYAMDY
38	VL 1A6		SVVMTQTPKFLLVSAGDRVTTTCKASQSVS NDVAWFQOKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTTISTVQAEDLAVYFCQQ DYNSPWTFGGGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 1A6	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 38	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 1A6	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 38	YASNRYT
	CDR-L3 VH 1D4	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 38	QQDYNSPWT
39	VH 1D8		QVQLQOQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS SYWIEWVKQRPBGHGLEWIGDILPGSGSTNY NEKFKDKATFTADTSFNTAYMQLSSLTSED SAVYYCATRRFRGLDYWGQGTTLTVSS
	CDR-H1 VH 1D8	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 39	SYWIE
	CDR-H2 VH 1D8	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO. 39	DILPGSGSTNYNEKFKD
	CDR-H3 VH 1D8	Residuos 99- 106 de SEQ ID NO. 39	RRFRGLDY

99 85
97

40	VL 1D8		SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVS NDVAWYQQKSGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTISTVQPEDLAVYFCQQ DYTSPFTFGSGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 1D8	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 40	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 1D8	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 40	YASNRYT
	CDR-L3 VH 1D8	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 40	QQDYTSPFT
41	VH 3G7		QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFN DYWIEWVKQRPBGHGLEWIGGFSGSGSTNY NEKFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSED SAVYYCARRRFRGMDYWGQGTSTVTVSS
	CDR-H1 VH 3G7	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 41	DYWIE
	CDR-H2 VH 3G7	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO. 41	GFSGSGSTNYNEKFRG
	CDR-H3 VH 3G7	Residuos 99- 106 de SEQ ID NO. 41	RRFRGMDY
42	VL 3G7		SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVS NDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTITTVQAEDLAVYFCQQ DYSSPWSFGGCKLEIKR
	CDR-L1 VH 3G7	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 42	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 3G7	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 42	YASNRYT
	CDR-L3 VH	Residuos 89-	

	3G7	97 de SEQ ID NO. 42	QQDYSSPWS
43	VH 5E8		QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYST DYSMHVVKQAPGKGLKMDWINTETGEPTY ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNED TATYFCRRRYRAFDYWGOGTTLTVSS
	CDR-H1 VH 5E8	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 43	DYSMH
	CDR-H2 VH 5E8	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO. 43	WINTETGEPTYADDFKG
	CDR-H3 VH 5E8	Residuos 99- 106 de SEQ ID NO. 43	RRYRAFDY
44	VL 5E8		STVMTQSPKFLVLSAGDRVITCKASQSVS NDVAWYQQKLGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTINTVQAEDLAVYFCQQ DYTSPYTFGGGTKLEIQR
	CDR-L1 VH 5E8	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 44	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 5E8	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 44	YASNRYT
	CDR-L3 VH 5E8	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 44	QQDYTSPYT
45	VH 8E1		EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS DYGMVWVRQAPGKGLEWVASISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDDPNNTLELQMRSLRSED TAMYYCARNPYWGOGTTLTVSS
	CDR-H1 VH 8E1	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 45	DYGMV
	CDR-H2 VH 8E1	Residuos 50- 66 de SEQ ID	SISSGSSNIYYADTVKG

		NO. 45	
	CDR-H3 VH 8E1	Residuos 99- 101 de SEQ ID NO. 45	NPY
46	VL 8E1		DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVG TNVAWYQQKPGQSPKGLIYSASHRYSGVPD RFAGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQ YNSYPLTFGGGTKLELKR
	CDR-L1 VH 8E1	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 46	KASQNVGTNVA
	CDR-L2 VH 8E1	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 46	SASHRYS
	CDR-L3 VH 8E1	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 46	QQYNSYPLT
47	VH 1H6		EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS DYGMVWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIHY ADTMKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSED TAMYYCARRHYAMDYWGQGTSVTVSS
	CDR-H1 VH 1H6	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 47	DYGMV
	CDR-H2 VH 1H6	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO. 47	YISSGSSTIHYADTMKG
	CDR-H3 VH 1H6	Residuos 99- 106de SEQ ID NO. 47	RHYAMDY
48	VL 1H6		SFVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVS NDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGTGYGTDFTTISTVQAEDLAVYFCQQ DYTSPFTFGSGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 1H6	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 48	KASQSVSNDVA

	CDR-L2 VH 1H6	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 48	YASNRYT
	CDR-L3 VH 1H6	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 48	QQDYTSPFT
49	VL 3A11		EVQLQQSGADLEKPGASVKLSCTASGFNIK DTFMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTKY DPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARWGQFGLLWNAMDYWGQGTSTVTV SS
	CDR-H1 VH 3A11	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 49	DTFMH
	CDR-H2 VH 3A11	Residuos 50- 66 de SEQ ID NO. 49	RIDPANGHTKYDPKFQG
	CDR-H3 VH 3A11	Residuos 99- 111 de SEQ ID NO. 49	WGQFGLLWNAMDY
50	VL 3A11		DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVD NYGISFMNWFQOKPGQPPKLLIYAASNQGS GVPARFSGSGSGTDFSLDIHPMEEDDTAMY FCQQSKEVPPTFGGGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 3A11	Residuos 24- 38 de SEQ ID NO. 50	RASESVDNYGISFMN
	CDR-L2 VH 3A11	Residuos 53- 60 de SEQ ID NO. 50	YAASNQGS
	CDR-L3 VH 3A11	Residuos 93- 101 de SEQ ID NO. 50	QQSKEVPPT
51	VH 4B4		QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSLSGFSLS TSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDSY SNPSLRSLTISRDTSRNQVFLRIATVDTA DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTSTVTVSS
	CDR-H1 VH	Residuos 31-	

77 103 89
101

	4B4	37 de SEQ ID NO. 51	TSGMGVS
	CDR-H2 VH 4B4	Residuos 52- 67 de SEQ ID NO. 51	HIWWDGDSYSNP SLRS
	CDR-H3 VH 4B4	Residuos 100-109 de SEQ ID NO. 51	RTRVNYAMDY
52	VL 4B4		SVVMTQTPKFLLVSAGDRVMTCKASQSVS NDVAWFQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQ DYN SPWTFGGGTKLEIKR
	CDR-L1 VH 4B4	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 52	KASQSVSNDVA
	CDR-L2 VH 4B4	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 52	YASNRYT
	CDR-L3 VH 4B4	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 52	QQDYN SPWT
53	VH 7G3		EVQLQQSGAEFVRSGASVKLSCTASGLNIK DYYIHFWVKQRPEQVLDWIGWIDPENGYSEY APRFQDKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCNP GELARYFDYWGQGTTTLTVSS
	CDR-H1 VH 7G3	Residuos 31- 35 de SEQ ID NO. 53	DYYIH
	CDR-H2 VH 7G6	Residuos 47- 66 de SEQ ID NO. 56	WIGWIDPENGYSEYAPRFQD
	CDR-H3 VH 7G3	Residuos 99- 107 de SEQ ID NO. 53	GELARYFDY

104 70
102

54	VL 7G3		DIVLSQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQ SIS KNLHWYQQKSHESPRLLIKY TSQ SISGIPS RFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFC QQ SISWPLTF GAGTKLELKR
	CDR-L1 VH 7G3	Residuos 24- 34 de SEQ ID NO. 54	RASQ SISKNLH
	CDR-L2 VH 7G3	Residuos 50- 56 de SEQ ID NO. 54	YTSQ SIS
	CDR-L3 VH 7G3	Residuos 89- 97 de SEQ ID NO. 54	QQSISWPLT

Las anteriores secuencias de CDR de anticuerpo anti-IL-12p40 aislado establecen una familia novedosa de proteínas de unión a IL-12p40, aisladas de acuerdo con esta invención, y que comprenden polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR listadas en la siguiente Tabla 6. Para generar y seleccionar las CDRs de la invención que tienen actividad de unión a y/o neutralizante IL-12p40 preferidas con respecto a hIL-12 y/o hIL-23, se pueden usar métodos conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente invención y evaluar las características de unión a y/o neutralización de la IL-12 y/o IL-23 de esas proteínas de unión, incluyendo, pero sin limitarse a las descritas específicamente aquí.

Tabla 6: **Ligandos de Afinidad a CDR de IL-12p40 de consenso (los residuos alternativos están listados por debajo de cada posición de amino ácido; - indica que el residuo puede estar ausente).**

Región CDR	Identificador De Secuencia	Secuencia De Consenso
CDR-H1	SEQ ID NO.:55	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ D Y Y I H - - K S V M G V S T T G E S W V S F
CDR-H2	SEQ ID NO.:56	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ H I Y W D D D K Y Y N P S L K - - - - D F W P G G G N T N Y N E K F S D F Q D G L H E S S S P T A D D V K G W S T A T P E I H D P T M Q R S N S I N T N K S Y D H S R G G
CDR-H3	SEQ ID NO.:57	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ R G I R S A M D Y - - - N T R V N Y A M D Y M D Y W R F Y G L D Y N A P Y F A F L W H Q A R M F
CDR-L1	SEQ ID NO.:58	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ K A S Q S V S N D V A - - - R E N I G T N G I S F M N D K Y L H
CDR-L2	SEQ ID NO.:59	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ Y A S N R Y T - S T A H N Q S S S S I G Q
CDR-L3	SEQ ID NO.:60	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ Q Q D Y N S P W T Y N T Y F S S K S V Y I E W L P

2. Anticuerpos Anti-IL-12p40 quiméricos

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones del anticuerpo son derivadas de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se discuten en detalle en el Ejemplo 2.1. Ver p.e., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; Pats. U.S. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que están incorporadas aquí por referencia en su totalidad. Adicionalmente, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454 que están incorporadas aquí por referencia en su totalidad) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad a antígeno apropiada, junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención son producidos reemplazando la región constante de cadena pesada de los anticuerpos anti IL-12 humana monoclonales murinos descritos en la sección 1 con una región constante de IgG1 humana. En una realización específica, el anticuerpo quimérico comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 51; o SEQ ID NO: 53 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 42; SEQ ID

NO: 44; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 48; SEQ BD NO: 50; SEQ ID NO: 52; o SEQ ID NO: 54.

3. Anticuerpos anti-IL-12p40 con CDR injertada

Los anticuerpos con CDr injertada de la invención comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en donde una o más de las regiones CDR de VH y/o VL son reemplazadas con secuencias de CDR de los anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia de marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como el molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de cadena recta en tal marco usualmente conduce a alguna pérdida de la afinidad de enlace al antígeno. A mayor homología de un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, será menos probable que la posibilidad que combinar las CDRs murinas con el marco humano introduzcan distorsiones en las CDRs que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, es preferible que el marco variable humano que es elegido para reemplazar el marco variable murino además de las CDRs tenga al menos un 65% de identidad de secuencia con el marco de región variable de anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humana y murina además de las CDRs tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es incluso más preferido que las regiones variables humana y murina además de las CDRs tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Lo más preferido es que las regiones variables humana y murina además de las CDRs tengan al menos 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se discuten en detalle en el Ejemplo 2.2. (ver también EP 239,400; Publicación PCT WO 91/09967; Pat. U.S. Nos. 5,225,539; 5,530,101; y 5,585,089), revestimiento o repavimentación (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein

Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)), y
mezclado de cadena (Pat. U.S. No. 5,565,352).

En una realización específica, la invención provee anticuerpos con CDR
injertada con cadenas VH y/o VL como se describen en la Tabla 7.

TABLA 7: Anticuerpos con CDR injertada

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
61 (6) (7) (8) (9)	VH 1D4.1 (FR1 VH2-70/JH6) (FR2 VH2-70/JH6) (FR3 VH2-70/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS KSVMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRGIRSAMDYWGQGT'TVTVSS
62 (23) (24) (25) (26)	VL 1D4.1 (FR1 B3/JK4) (FR2 B3/JK4) (FR3 B3/JK4) (FR4 B3/JK4)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD RFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
63 (10) (7) (11) (9)	VH 1D4.2 (FR1 VH2-26/JH6) (FR2 VH2-70/JH6) (FR3 VH2-26/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVTLKESGPVLVKPTETTLTLTCTVSGFSLS KSVMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCARRGIRSAMDYWGQGT'TVTVSS

109 95
124

64	VL 1D4.2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
(27)	(FR1 L2/JK4)	
(28)	(FR2 L2/JK4)	
(29)	(FR3 L2/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	
65	VH 1D4.3	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS KSVMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRILTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRGIRSAMDYWGQGTITVTVSS
(6)	(FR1 VH2-70/JH6)	
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	
(8)	(FR3 VH2-70/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
66	VL 1D4.3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
(27)	(FR1 L2/JK4)	
(28)	(FR2 L2/JK4)	
(29)	(FR3 L2/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	
67	VH 1A6.1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSRILTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTITVTVSS
(6)	(FR1 VH2-70/JH6)	
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	
(8)	(FR3 VH2-70/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
68	VL 1A6.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
(23)	(FR1 B3/JK4)	
(24)	(FR2 B3/JK4)	
(25)	(FR3 B3/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	
69	VH 1A6.2	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSRILTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTITVTVSS
(10)	(FR1 VH2-26/JH6)	
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	
(11)	(FR3 VH2-26/JH6)	

(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
70 (27) (28) (29) (26)	VL 1A6.2 (FR1 L2/JK4) (FR2 L2/JK4) (FR3 L2/JK4) (B3 L2/JK4)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAVYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTITSSSQSEDFAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
71 (12) (13) (14) (9)	VH 8E1.1 (FR1 VH3-72/JH6) (FR2 VH3-72/JH6) (FR3 VH3-72/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMVWVRQAPGKGLEWVGSISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED TAVYYCARNPYWGQGTTVTVSS
72 (30) (31) (32) (26)	VL 8E1.1 (FR1 L15/JK4) (FR2 L15/JK4) (FR3 L15/JK4) (FR4 B3/JK4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQNVG TNVAVYQQKPEKAPKSLIYSASHRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ YNSYPLTFGGGKVEIKR
73 (15) (16) (17) (9)	VH 8E1.2 (FR1 VH3-21/JH6) (FR2 VH3-21/JH6) (FR3 VH3-21/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMVWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARNPYWGQGTTVTVSS
74 (33) (34) (32) (26)	VL 8E1.2 (FR1 L15/JK4) (FR2 L15/JK4) (FR3 L15/JK4) (FR4 B3/JK4)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCKASQNVG TNVAVYQQKPGKAPKLLIYSASHRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ YNSYPLTFGGGKVEIKR
75 (18) (19)	VH 3G7.1 (FR1 VH1-69/JH6) (FR2 VH1-69/JH6)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS DYWIEWVRQAPGQGLEWMGGFSGSGSTNY NEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRRFRGMDYWGQGTTVTVSS

111 97
109

(20)	(FR3 VH1-69/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
76	VL 3G7.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ DYSSPWSFGGGTKVEIKR
(23)	(FR1 B3/JK4)	
(24)	(FR2 B3/JK4)	
(25)	(FR3 B3/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	
77	VH 3G7.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYWIEWVRQAPGQGLEWMGGFSGSGSTNY NEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARRRFRGMDYWGQGTTVTVSS
(21)	(FR1 VH1-18/JH6)	
(19)	(FR2 VH1-69/JH6)	
(22)	(FR3 VH1-18/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
78	VL 3G7.2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ DYSSPWSFGGGTKVEIKR
(27)	(FR1 L2/JK4)	
(28)	(FR2 L2/JK4)	
(29)	(FR3 L2/J K4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	
67	VH 1A6.5	EVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTTVTVSS
(6)	(FR1 VH2-70/JH6)	
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	
(8)	(FR3 VH2-70/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
70	VL 1A6.5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
(27)	(FR1 L2/JK4)	
(28)	(FR2 L2/JK4)	
(29)	(FR3 L2/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	

69	VH 1A6.6	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTTVTVSS
(10)	(FR1 VH2-26/JH6)	
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	
(11)	(FR3 VH2-26/JH6)	
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	
68	VL 1A6.6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
(23)	(FR1 B3/JK4)	
(24)	(FR2 B3/JK4)	
(25)	(FR3 B3/JK4)	
(26)	(FR4 B3/JK4)	

4. Anticuerpos Anti-IL-12p40 Humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de anticuerpo de especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humana conocidas se revelan, p.e., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/rr.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrcT/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html;

www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; anticuerpo.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/SlideOl.html; www.cryst.bbk.ac.Uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrcV/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una incorporada aquí totalmente por referencia. Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potencial o modificar la unión, afinidad, velocidad on, velocidad off, avidéz, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos de marco en las regiones marco humanas pueden ser sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de marco son identificadas mediante métodos bien conocidos en la técnica, p.e., modelamiento de las interacciones de las CDR y los residuos de marco para identificar residuos de marco importantes para la unión a antígeno y la

comparación de secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Ver, p.e., Queen et al., Pat U.S. No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), que están incorporada aquí por referencia en su totalidad). Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares a los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p.e., el análisis de residuos que influyen la habilidad de la secuencia de inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar desde las secuencias de consenso e importadas de forma que se alcanza la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados influenciando la unión de antígeno. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero sin limitarse, a las descritas en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); Publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Pat. U.S. Nos. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, cada una

115 9/27
AS

incorporada enteramente aquí por referencia, incluidas las referencias citadas allí.

C. Producción de Anticuerpos y Líneas Celulares que Producen Anticuerpo

Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-12p40 de la presente invención, muestran una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-12, p.e., evaluada mediante uno cualquiera de varios ensayos in vitro e in vivo conocidos en la técnica (p.e., ver Ejemplo I.I.C). Por ejemplo, estos anticuerpos neutralizan la producción de interferona gamma inducida por IL-12 mediante blastos de PHA con valores IC_{50} en el rango de al menos aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M, o aproximadamente 10^{-10} M. Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-12p40 de la presente invención, también exhiben una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de IL-23.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a IL-12p40 humana, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se disocia de la IL-12p40 humana con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $0.1s^{-1}$ o menor, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o que inhibe la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de la IL-12p40 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2}s^{-1}$ o menor, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-7} M o menor. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de la IL-12p40 humana con una constance de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ o menor,

determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la IL-12 humana y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-8} M o menor. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de la IL-12p40 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menor, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de la IL-12p40 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-12 y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede disociar de la IL-12p40 humana con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ o menos, determinada mediante resonancia de plasmón superficial, o puede inhibir la actividad de IL-12 y/o IL-23 humana con un IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-11} M o menos.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada IgG1 o una región constante de cadena pesada IgG4. Adicionalmente, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Los reemplazos de residuos de amino ácido en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, *et al.* PAT US NOS 5,648,260; 5624821). La porción de Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes p.e. inducción de citoquina, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y vida media/velocidad de depuración del anticuerpo y los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpo terapéutico pero en otros casos puede ser innecesaria, incluso perjudicial, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median la ADCC y CDC via unión a FcγRs y C1q de complemento, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media en circulación de los anticuerpos. Aún en otra realización, al menos un residuo de amino ácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, de forma que las funciones efectoras del anticuerpo son alteradas.

Una realización provee una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es derivada o enlazada a otra molécula funcional (p.e., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la invención puede ser derivada enlazando funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p.e., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar asociada del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Agentes detectables útiles con los cuales se puede derivar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamin-1-naftalensulfonil cloruro, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede ser derivado con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo es derivado con una enzima detectable, este es detectado agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede ser derivado con biotina, y detectado a través de medición indirecta de unión de avidina o estreptavidina.

Otra realización de la invención provee una proteína de unión cristalizada. Preferiblemente, la invención se relaciona con cristales de anticuerpos anti-IL-12p40 enteros y fragmentos de los mismos como se revelan aquí, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una vida media mayor *in vivo* que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión retiene la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención puede ser producida de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y como se revelan en WO 02072636, incorporados aquí por referencia. Otra realización de la invención provee una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteína *in vivo* naciente puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-translacional. En particular, los

residuos de azúcar (glicosil) pueden ser agregados enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacárido enlazadas covalentemente son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidrato en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con efecto mínimo en la unión a antígeno o vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto en la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo en la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debida al impedimento estérico (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367), o produce afinidad aumentada para el antígeno (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente invención está dirigido a generar mitantes de sitio de glicosilación en los cuales el sitio de glicosilación O- o N-enlazado de la proteína de unión ha sido mutado. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes usando tecnologías bien conocidas estándar. Los mutantes del sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica pero tienen actividad de unión aumentada o disminuida son tro objeto de la presente invención.

En aún otra realización, la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención es modificada. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (p.e., el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato pueden ser realizadas, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más

sustituciones de amino ácido que producen la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de región variable para eliminar de este modo la glicosilación de ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tal criterio se describe en mayor detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2, y las Pat. U.S. Nos. 5,714,350 y 6,350,861, cada una de las cuales está incorporada aquí por referencia en su totalidad.

Adicionalmente o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo modificado de la invención que tiene un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc de bisectación. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la habilidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidrato pueden realizarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedera con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y se pueden usar como células hospederas en las cuales se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para de este modo producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como la Patente Europea No: EP 1,176,195; Publicaciones PCTs WO 03/035835; WO 99/54342 80, cada una de las cuales está incorporada aquí por referencia en su totalidad.

La glicosilación de proteína depende de la secuencia de amino ácido de la proteína de interés, así como la célula hospedera en la cual se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (pe., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótido) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de proteína, y la composición de los residuos glicosil,

puede diferir en el sistema hospedero en el cual se expresa la proteína particular. Los residuos glicosil útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de forma que el patrón de glicosilación es humano.

Los expertos en la técnica saben que variar la glicosilación de la proteína puede producir diferentes características de proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un hospedero microorganismo, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de levadura puede ser reducida comparada con la de la misma proteína expresada en una célula mamífera, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en humanos y muestran vida media reducida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosil específicos y promover la rápida depuración de la proteína en la corriente sanguínea. Otros efectos adversos pueden incluir cambios del plegamiento de proteína, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tráfico, transporte, compartimentalización, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenicidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición y patrón de glicosilación idéntico, o al menos similar, al producido en células humanas o en las células específicas de especie del animal sujeto destinado.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula hospedera puede lograrse modificando genéticamente la célula hospedera para expresar las enzimas de glicosilación heterólogas. Usando técnicas conocidas en el arte un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de proteína humana. Por ejemplo, las cepas de levadura han sido genéticamente modificadas para

expresar enzimas de glicosilación que no se encuentran naturalmente de forma que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteína idéntica a la de células de animal, especialmente células humanas (solicitudes de patente U.S. 20040018590 y 20020137134 y Publicación PCT WO2005100584 A2).

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está dirigida a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para las proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse inmunizando un animal con la proteína de unión o una región que contiene CDR de la misma. El animal inmunizado reconocerá, y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirán un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuerpo llamado anti-anti-Id.

Adicionalmente, el experto en la técnica apreciará que una proteína de interés puede ser expresada usando una genoteca de células hospederas diseñadas genéticamente para expresar varias enzimas de glicosilación, de forma que las células hospederas miembros de la genoteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un profesional puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con patrones de glicosilación novedosos particulares. Preferiblemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

D. Usos de Anticuerpos Anti-IL-12p40

Dada su habilidad para unirse a IL-12p40 humana, los anticuerpos anti-IL-12p40 humana, o porciones de los mismos, de la invención se pueden usar para detectar IL-12 y/o IL-23 humana (p.e., en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La invención provee un método para detectar IL-12 y/o IL-23 humana en una muestra biológica que comprende contactar una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención y detectar anticuerpo (o porción de anticuerpo) enlazado a IL-12 y/o IL-23 humana o anticuerpo no enlazado (o porción de anticuerpo), para de esta forma detectar la IL-12 y/o IL-23 humana en la muestra biológica. El anticuerpo está directamente o indirectamente marcado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo enlazado o no enlazado. Sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

Alternativo al marcado del anticuerpo, la IL-12 humana puede ser ensayada en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando estándares de rhIL-12 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-12p40 humana no marcado. En este ensayo, la muestra

biológica, los estándares de rhIL-12 marcados y el anticuerpo anti-IL-12p40 humana son combinados y se determina la cantidad de estándar de rhIL-12 marcado enlazado al anticuerpo no marcado. La cantidad de IL-12 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhIL-12 marcado enlazado al anticuerpo anti-IL-12p40. Igualmente, la IL-23 humana puede también ser ensayada en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando estándares de rhIL-23 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-12p40 humana no marcado.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención son preferiblemente capaces de neutralizar la actividad de IL-12 humana y/o IL-23 humana tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, tales anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de IL-12 y/o IL-23, p.e., en un cultivo de célula que contiene hIL-12 y/o hIL-23, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-12 y/o hIL-23 con los cuales un anticuerpo de la invención reacciona cruzadamente. En una realización, la invención provee un método para inhibir la actividad de hIL-12 y/o hIL-23 que comprende contactar hIL-12 y/o hIL-23 con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de forma que se inhibe la hIL-12 y/o hIL-23. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene hIL-12 y/o hIL-23, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser agregado al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-12 y/o hIL-23 en el cultivo.

En otra realización, la invención provee un método para reducir la actividad de hIL-12 y/o hIL-23 en un sujeto, convenientemente en un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno en el cual la actividad de IL-12 o IL-23 es perjudicial. La invención provee métodos para reducir la actividad de IL-12 y/o IL-23 en un sujeto que sufre de tal enfermedad o trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto un anticuerpo o porción de anticuerpo de la

invención de forma que la actividad de IL-12 y/o IL-23 en el sujeto es reducida. Preferiblemente, la IL-12 es IL-12 humana, la IL-23 es IL-23 humana, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa una IL-12 y/o IL-23 a la cual un anticuerpo de la invención es capaz de unirse. Aún adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero al cual se le ha introducido IL-12 y/o IL-23 (p.e., mediante la administración de IL-12 y/o IL-23 o por expresión de un transgen de IL-12 y/o IL-23). Unn anticuerpo de la invención puede ser administrado a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Más aún, un anticuerpo de la invención puede ser administrado a un mamífero no humano que expresa una IL-12 y/o IL-23 con el cual es capaz de unirse para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (p.e., ensayando las dosis y cursos de tiempo de la administración).

Como se usa aquí, el término "un trastorno en el cual la actividad de IL-12 y/o IL-23 es perjudicial" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los cuales se ha mostrado que la presencia de IL-12 y/o IL-23 en un sujeto que sufre del trastorno es o se sospecha que es ya sea responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye con un emperoamiento del trastorno. En consecuencia, u trastorno en el cual la actividad de IL-12 y/o IL-23 es perjudicial es un trastorno en el cual se espera que la reducción de la actividad de IL-12 y/o IL-23 alivie los síntomas y/o progresión del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento de la concentración de IL-12 y/o IL-23 en un fluido biológico de un sujeto que sufre del trastorno (p.e., un aumento de la concentración de IL-12 y/o IL-23 en suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto), que puede ser detectado, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-12p40 como se describió anteriormente. Ejemplos no limitantes de trastornos que pueden ser tratados con los anticuerpos de la invención incluyen aquellos trastornos discutidos en la sección siguiente

relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

D. Composición farmacéutica

La invención provee también composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para uso en, pero sin limitarse a, diagnóstico, detección, o monitoreo de un trastorno, para prevenir, tratar, manejar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención, en otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes a los anticuerpos de la invención para el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de IL-12 y/o IL-23 es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos son conocidos por ser útiles para, o que han sido o están siendo usados en la prevención, tratamiento, manejo, o mejoramiento de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede además comprender un vehículo, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden ser incorporadas en las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además comprender cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, preservantes o amortiguadores, que mejoran la vida de conservación o efectividad del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Varios sistemas de liberación son conocidos, y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, p.e., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (ver, p.e., Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico comp parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p.e., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración mucosa (p.e., rutas intranasal y oral). Adicionalmente, se puede emplear la administración pulmonar, p.e., mediante el uso de in inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosol. Ver, p.e., Pat. U.S. Nos. 6, 019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934, 272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290, 540, y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales está incorporada aquí por referencia en su totalidad. En una realización, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, o una composición de la

128 114
126

invención es administrada usando tecnología de liberación de fármaco pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados intramuscularmente, intravenosamente, intratumoralmente, oralmente, intranasalmente, pulmonar, o subcutáneamente. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden ser administrados por cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimiento epitelial o mucocutáneo (p.e., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y de ninguna forma de limitación, mediante infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, dicho implante es de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialastic, polímeros, matrices fibrosas (p.e., Tissuel®), o matrices de colágeno. En una realización, una cantidad efectiva de uno o más agonistas de los anticuerpos de la invención es administrada localmente al área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención es administrada localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (p.e., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes del anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede ser liberado en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una

realización, se puede usar una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (ver Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (ver p.e., Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); U.S. Pat. No. 5,679,377; Pat. U.S. No. 5, 916,597; Pat U.S. No. 5,912,015; Pat U.S. No. 5,989,463; Pat U.S. No. 5,128,326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilen glicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas removibles, estable al almacenamiento, estéril, y biodegradable. En ya otra realización, un sistema de liberación controlada o sostenida puede ser colocado en la proximidad del agente profiláctico o terapéutico, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica (ver, p.e., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada son discutidos en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por el experto en la técnica para producir formulaciones de liberación

116
128

130

sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, p.e., Pat. U.S. No. 4,526, 938, Publicación PCT WO 91/05548, Publicación PCT WO 96/20698, Ning et al. , 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, cada uno de los cuales está incorporado aquí por referencia en su totalidad.

En una realización específica, cuando la composition de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede ser administrado in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de forma que se vuelve intracelular, p.e., mediante el uso de un vector retroviral (ver Pat. U.S. No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartícula (p.e., una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en unión con un péptido del tipo homeobox que es conocido por entrar al núcleo (ver, p.e., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de célula hospedera para la expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta de administración destinada. Ejemplos de rutas de

129
117
(31)

administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, p.e., administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p.e., inhalación), transdérmica (p.e., tópica), transmucosa, y rectal. En una realización específica, la composición es formulada de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal, o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para mitigar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención son para ser administradas tópicamente, las composiciones pueden ser formuladas en la forma de un unguento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, atomizador, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida por el experto en la técnica. Ver, p.e., Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosis tópicas no atomizables, se emplean típicamente formas viscosas a semisólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que la del agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, unguentos, polvos, linimentos, bálsamos, y similares, que son, si se desea, esterilizadas o mezcladas con agentes auxiliares (p.e., preservantes, estabilizantes, agentes humectantes, amortiguadores, o sales) para influenciar varias propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosis tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol atomizables en donde el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, es empacado en una mezcla con un volátil presurizado (p.e., un gas propelente, tal como freón) o en una botella exprimible. También se

418
130
132

pueden agregar hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosis si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede ser formulada en una forma de aerosol, atomizador, rocío o en la forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser liberados convenientemente en la forma de una presentación de atomizador en aerosol de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p.e., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis puede ser determinada proporcionando una válvula para liberar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos (compuestos de, p.e., gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden ser formulados conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones pueden ser formuladas oralmente en la forma de tabletas, cápsulas, cachets, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Las tabletas o cápsulas pueden ser preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p.e., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (p.e., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (p.e., estearato de magnesio, talco, o sílice); desintegradores (p.e., almidón de papa o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (p.e., lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero sin limitarse a, soluciones,

249
133

jarabes o suspensiones, o pueden ser presentadas como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden ser preparadas por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p.e., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (p.e., lecitina o acacia); vehículo no acuoso (p.e., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (p.e., metil o propil-p- hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes y agentes endulzantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden ser convenientemente formuladas para liberación lenta, liberación controlada, o liberación sostenida de agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, p.e., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosol. Ver, p.e., Pat. U.S. Nos. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales está incorporada aquí por referencia en su totalidad. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación, y/o composición de la invención es administrada usando tecnología de liberación de fármaco Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (p.e., mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden ser presentadas en forma de dosis unitaria (p.e., en ampollas o recipientes de dosis múltiples) con un preservante adicionado. Las

120
122
134

composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosis o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (p.e., agua estéril libre de pirógeno) antes de uso. Los métodos de la invención pueden adicionalmente comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de larga acción pueden ser administradas mediante implantación (p.e., subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden ser formuladas con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (p.e., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (p.e., como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes, tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. [0262] Generalmente, los ingredientes de las composiciones son suministrados ya sea separadamente o mezclados juntos en la forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril grado farmacéutico. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proveer una ampolla de agua

12
133
135

estéril para inyección o solución salina de forma que los ingredientes pueden ser mezclados antes de la administración.

En particular, la invención también provee que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención sean empacadas en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención son suministradas como un polvo liofilizado estéril seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y que puede ser reconstituido (p.e., con agua o solución salina) a la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferiblemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministradas como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente en una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención deben ser almacenados entre 2 °C y 8 °C., en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deben ser administradas dentro de 1 semana, preferiblemente dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas, o dentro de 1 hora después de ser reconstituida. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención son suministradas en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente. Preferiblemente, la forma líquida de la composición administrada es suministrada en un recipiente sellado herméticamente a al menos 0.25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0.5 mg/ml, al menos 1

134
136

mg/ml, al menos 2.5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe ser almacenada entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden ser incorporados en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml del anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta ya sea de un líquido o forma de dosis liofilizada en un pedernal o vial ámbar, ampolla o jeringa prellenada. El amortiguador puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros amortiguadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Se puede usar cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de masa para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (óptimamente 2-4%). Se pueden usar estabilizantes en las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente 1-50 mM de L-Metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de masa adecuados incluyendo glicina, arginina, pueden ser incluidos como 0-0.05% de polisorbato-80 (óptimamente 0.005-0.01%). Otros surfactantes adicionales incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 y surfactantes BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención preparados como una solución inyectable para administración parenteral, pueden además comprender un agente útil como un adjuvant, tal como los usados para aumentar la absorción, o dispersión de

123
135
137

una proteína terapéutica (p.e., anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de inyección (p.e. más de 1 ml) con menor dolor e incomodidad, e incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección, (ver WO2004078140, US2006104968 incorporadas aquí por referencia).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p.e., soluciones inyectables o para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración destinado y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como las composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (p.e., intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo es administrado por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo es administrado por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo (p.e., anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los

129
136
138

ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, después de la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones son preparadas incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por aspersion que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula deseado en el caso de dispersión, y mediante el uso de surfactantes. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada incluyendo, en la composición, un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monostearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente invención pueden ser administrados mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como lo apreciará el experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., *Sustained*

125
~~124~~
139

and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) y también pueden estar encerrados en una cápsula en concha de gelatina dura o blanda, comprimidos en tabletas, o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con excipientes y ser usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, galletas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención por administración diferente a parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es coformulado con y/o coadministrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los cuales la actividad de la IL-12 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 o porción de anticuerpo de la invención puede ser coformulado y/o coadministrado con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos (p.e., anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que se unen a moléculas de superficie celular). Adicionalmente, uno o más anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden convenientemente utilizar menores dosis de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

126
438
140

En ciertas realizaciones, un anticuerpo a IL-12 o fragmento del mismo está enlazado a un vehículo que extiende la vida media conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el domino Fc, polietilen glicol, y dextrano. Tales vehículos están descritos, p.e., en el Serial de Solicitud U.S. No. 09/428,082 y Solicitud PCT publicada No. WO 99/25044, que están incorporados en la presente por referencia para cualquier propósito.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótido que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, son administradas para tratar, prevenir, manejar, o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo a manera de terapia del gen. La terapia del gen se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que se puede expresar. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico de la invención que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Se puede usar cualquiera de los métodos para terapia del gen disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia del gen, ver Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Rriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de varios

191 #27
129

métodos de terapia del gen se revelan en US20050042664, todas las cuales están incorporadas aquí por referencia.

La interleucina 12 juega un papel crítico en la patología asociada con una variedad de enfermedades que involucran elementos inmunes e inflamatorios. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis soriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto hospedero, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignancias, falla cardíaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de distrés respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía soriática, artropatía colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, artropatía asociada con yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollar autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica

positiva Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovárica, falla ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a la insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con transplante de órgano, enfermedad inmune crónica asociada con transplante de órgano, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, soriasis tipo 1, soriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritides, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide,

infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de la esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjörgren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipertiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda vitiligo, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis inducida por Fármaco, Esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección estreptocócica del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.e., depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas Tipo Th1 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal, y malignancias hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, falla renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de célula del cuerno anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxismal), aleteo auricular, bloqueo atrioventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de

199 130
142

transplante de médula espinal (BMT), bloqueo de ramas de fascículo, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por bypass cardiopulmonar, rechazo de transplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, falla cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con la terapia de citoquina, Demencia pugilística, enfermedades de desmielinación, fiebre de dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, Enfermedad con cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, Síndrome de Down en la madurez, trastornos de movimiento inducidos por fármaco, inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eccema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de célula vellosa, enfermedad de Hallerorden-Spatz, tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias His de fascículo, neuropatía por infección de VIH/VIH, enfermedad de Hodgkin,

trastornos de movimiento hipercinéticos, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis de hipersensibilidad, hipertensión, trastorno de movimientos hipocinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, ataque isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de transplante de tumor, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de transplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococcemia, metabólica/idiopática, dolores de cabeza migrañosos, trastornos del multi sistema mitocondrial, enfermedad de tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, micobacteria aviar intracelular, tuberculosis por micobacteria, síndrome mielodisplásico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofas musculares neurogénicas I, fiebre neutropénica, linfoma diferente de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia con okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo de transplante de paratiroide, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardica, enfermedad aterlosclerótica periférica, trastornos vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome post perfusión, síndrome post bombeo, síndrome de cardiotoromía

post-MI, preeclampsia, Parálisis Supranuclear Progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynoud, enfermedad de Refsum, taquicardia con QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil del tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de célula de hoz, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de transplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, célula T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis vital/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico vital asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, (ver Peritt et al. Publicación PCT No. WO2002097048A2, Leonard et al., Publicación PCT No. WO9524918 A1, y Salfeld et al., Publicación PCT No. WO00/56772A1).

Los anticuerpos, y porciones de anticuerpo de la invención se pueden usar para tratar humanos que sufren de enfermedades autoinmunes, en particular aquellas asociadas con inflamación, incluyendo, espondilitis reumatoide, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos, se usan para tratar la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina y soriasis.

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención también puede ser administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Se entenderá que los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, p.e., un agente terapéutico, dicho agente adicional es seleccionado por el experto para su propósito destinado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para tratar la enfermedad o condición que es tratada por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo benéfico a la composición terapéutica p.e., un agente que afecta la viscosidad de la composición.

Se entenderá además que las combinaciones que serán incluidas dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito destinado. Los agentes indicados más adelante son para propósitos ilustrativos y se pretende que sean limitados. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas siguientes. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, p.e., dos o tres agentes si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función destinada.

Las proteínas de unión descritas aquí se pueden usar en combinación con agentes terapéuticos adicionales tales como un Fármaco Anti-reumático Modificador de Enfermedad (DMARD) o un Fármaco Antiinflamatorio

Noesteroidal (NSAID) o un esteroide o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos preferidos de un DMARD son hidroxicloroquina, leflunomida, metotrexato, oro parenteral, oro oral y sulfasalazina. Ejemplos preferidos de fármaco(s) anti-inflamatorio(s) no esteroideal(es) también referidos como NSAIDS incluyen fármacos como ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son corticosteroides que incluyen prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroide pueden ser reducidos o incluso eliminados estrechando la dosis de esteroide requerida al tratar pacientes en combinación con los anticuerpos anti-IL-12 de esta invención. Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: fármaco(o) anti-inflamatorio(s) supresor(es) de citoquina (CSAIDs); anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, interferonas, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con anticuerpos a moléculas de superficie de celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos de la cascada inflamatoria autoinmune y posterior; ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF tales como receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos (p75TNFR1gG (EnbrelTM) o p55TNFR1gG (Lenercept), anticuerpos de TNF quiméricos, humanizados o humanos, o un fragmento de los mismos, incluyendo infliximab (Remicade®), Johnson y Johnson; descrito en la Pat. U.S. No. 5,656,272, incorporada por referencia aquí), CDP571 (un anticuerpo IgG4 anti-TN α monoclonal humanizado), CDP 870 (un fragmento de anticuerpo anti-TNF- α monoclonal humanizado), un dAB anti-TNF (Peptech), CNTO 148 (golimumab; Medarex y

Centocor, ver WO 02/12502), y adalimumab (Humira® Abbott Laboratories, un mAb anti-TNF humano, descrito en US 6,090,382 como D2E7). Anticuerpos de TNF adicionales que se pueden usar en la invención se describen en la Pat. U.S. Nos. 6,593,458; 6,498,237; 6,451,983; y 6,448,380, cada una de las cuales está incorporada por referencia aquí. Otras combinaciones que incluyen inhibidores de la enzima convertidora de $\text{TNF}\alpha$ (TACE); inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de Interleucina-1, 1L-1RA etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen Interleucina 11. Aún otra combinación preferida son otros actores claves de la respuesta autoimmune que pueden actuar paralelos a, dependientes de o en concierto con la función IL-12; son especialmente preferidos los antagonistas de IL-18 incluyendo anticuerpos IL-18 o receptores IL-18 solubles, o proteínas de unión a IL-18. Se ha mostrado que la IL-12 e IL-18 tienen superposición pero distintas funciones y una combinación de antagonistas a ambas puede ser lo más efectivo. Aún otra combinación preferida son inhibidores anti-CD4 de depleción. Aún otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de la ruta co-estimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonísticos.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser combinados con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquinina/hidroxiclороquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colicina, corticosteroides (oral, inhalado e inyección local), agonistas del adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipatropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosin, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes

que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como $\text{TNF}\alpha$ o IL-1 (p.e. IRAK, NTK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de $\text{TNF}\alpha$ (TACE), inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFRlgG (EnbrelTM y p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), citoquinas antiinflamatorias (e.g. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β), celecoxib, ácido fólico, sulfato de hidroxycloquina, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxeno, valdecoxib, sulfasalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato de oro sólido, aspirina, triamcinolona acetona, napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, sodio diclofenaco, oxaprozina, hcl oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, sodio diclofenaco/misoprostol, fentanil, anakinra, recombinante humano, hcl tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofén, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulf de glucosamina/condroitina, hcl amitriptilina, sulfadiazina, hcl oxicodona/acetaminofén, hcl olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, ciclofosfamida, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, y Mesopram. Combinaciones preferidas incluyen metotrexato o lefiunomida y, en casos de artritis reumatoide moderada o severa, ciclosporina.

Agentes adicionales no limitantes que se pueden usar también en combinación con un anticuerpo IL-12 o IL-23, o porción de unión a antígeno del mismo, para tratar artritis reumatoide incluyen, pero no se limitan a, los

siguientes: fármaco(s) antiinflamatorio(s) no esteroideal(es) (NSAIDs); fármaco(o) anti-inflamatorio(s) supresor(es) de citoquina) (CSADDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Bayer); cA2/infliximab (anticuerpo anti-TNF α quimérico; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/etanercept (proteína de fusión de 75 kD de receptor de TNF-IgG; Immunex; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kdTNF-IgG (proteína de fusión de 55 kD de receptor de TNF-IgG; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado de no depleción; IDEC/SmithKline; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-1L-2 (proteínas de fusión a IL-2; Seragen; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); Anti-Tac (anti-IL-2R α humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citoquina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citoquina anti-inflamatoria; DNAX/Schering); agonistas de IL-4; IL-10 y/o IL-4 (p.e., anticuerpos agonistas); IL-1RA (antagonista del receptor IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); proteína de unión TNF-bp/s-TNF (proteína de unión a TNF soluble; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42); R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); MK-966 (inhibidor de COX-2; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S81); Iloprost (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S82); metotrexato; talidomida (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282) y fármacos relacionados con talidomida (p.e., Celgen); lefiunomida (anti-inflamatorio e inhibidor de citoquina; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107); ácido tranexámico (inhibidor de la activación de plasminógeno; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284); inhibidor de T-614 (inhibidor de citoquina; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9

152 37
150

(suplemento), S282); prostaglandina E1 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); Tenidap (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal; ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S280); Naproxeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal; ver p.e., *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213); Meloxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal); Ibuprofeno (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal); Piroxicam (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal); Diclofenaco (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal); Indometacina (fármaco anti-inflamatorio no esteroideal); Sulfasalazina (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281); Azatioprina (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281); inhibidor de ICE (inhibidor de la enzima convertidora de enzima interleucina-1 β); inhibidor de zap-70 y/o lck (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o lck); inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R (inhibidores del factor de crecimiento celular endotelial vascular o receptor del factor de crecimiento celular endotelial vascular; inhibidores de angiogénesis); fármacos anti-inflamatorios corticosteroides (p.e., SB203580); inhibidores de TNF-convertasa; anticuerpos anti-IL-12; anticuerpos anti-IL-18; inhibidores de interleucina-11 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S296); interleucina-13 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S308); interleucina-17 (ver p.e., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S 120); oro; penicilamina; cloroquina; clorambucil; hidroxiclороquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiación de linfóide total; globulina anti-timocita; anticuerpos anti-CD4; CD5-toxinas; péptidos y colágeno administrados oralmente; lobenzarit disódico; Agentes Reguladores de Citoquina (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligo-desoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble 1 (TPIO; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de pez y semillas de planta; ver p.e., DeLuca et al.

(1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; globulina inmune intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; antivirales; y agentes moduladores inmunes.

En una realización, el anticuepro IL-12, o porción de unión a antígeno del mismo, es administrado en combinación con uno o más de los siguientes agentes, para el tratamiento de artritis reumatoide: inhibidor de molécula pequeña de KDR (ABT-123), inhibidor de molécula pequeña de Tie-2; metotrexato; prednisona; celecoxib; ácido fólico; sulfato de hidroxiclороquina; rofecoxib; etanercept; infliximab; leflunomida; naproxeno; valdecoxib; sulfasalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato de oro sólido, aspirina, azatioprina; triamcinolona acetónida; napsilato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenaco, piroxicam, etodolac, sodio diclofenaco, oxaprozina, hcl oxicodona, bitartrato de hidrocodona/apap, sodio diclofenaco/misoprostol, fentanil, anakinra, recombinante humano, hcl tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/fa/piridoxina, acetaminofén, alendronato sódico, prednisolona, sulfato de morfina, clorhidrato de lidocaína, indometacina, sulfato de glucosamina/condroitina,; ciclosporina; hcl amitriptilina, sulfadiazina, hcl oxicodona/acetaminofén, hcl olopatadina, misoprostol, naproxeno sódico, omeprazol, micofenolato mofetil; ciclofosfamida; rituximab; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; ABT-874; ABT-325 (anti-IL 18); anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; y mesopram. En otra realización, un anticuerpo IL-12 o IL-23, o porción de unión a antígeno del mismo, es administrado para el tratamiento de un trastorno relacionado con IL-12 o IL-23 en combinación con uno de los agentes mencionados anteriormente para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la enfermedad inflamatoria del intestino con los cuales se puede combinar in anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipooxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor IL-1; anticuerpos anti-IL-1 β monoclonales; anticuerpos anti-IL-6 monoclonales; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser combinados con agentes tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSABDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosin, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p.e., IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e. receptores de TNF p55 o p75

solubles, sIL-1RI, sIL-IRII sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p.e. IL-4, IL-10, IL-11, IL- 13 y TGF β).

Ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn en los cuales se puede combinar un anticuerpo o una porción de unión a antígeno, incluyen los siguientes: antagonistas de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, construcciones de TNFR-Ig, inhibidores (p75TNFRIgG (ENBREL) y p55TNFRIgG (LENERCEPT)) e inhibidores de PDE4. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser combinados con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con la síntesis o acción de citoquinas proinflamatorias tales IL-1, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β e IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar con inhibidores de la señalización de célula T, por ejemplo, los inhibidores de tirosina quinasa 6-mercaptopurinas. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con IL-11. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con mesalamina, prednisona, azatioprina, mercaptopurina, infliximab, succinato de metilprednisolona sódica, sulfato de difenoxilato/atrop, clorhidrato de loperamida, metotrexato, omeprazol, folateo ciprofloxacina/dextrosa-agua, bitartrato de hidrocodona/apap, clorhidrato de tetraciclina, fluocinonida, metronidazol, timerosal/ácido bórico, colestiramina/suacarosa, clorhidrato de ciprofloxacina, sulfato de hiosciamina, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de midazolam, hcl oxicodona/acetaminofén, clorhidrato de prometazina, fosfato de sodio, sulfametoxazol/trimetoprim, celecoxib, polycarbofilo, napsilato de propoxifeno,

hidrocortisona, multivitaminas, balsalazida disódica, fosfato de codeína/apap, hcl colesevelam, cianocobalamina, ácido fólico, levofloxacina, metilprednisolona, natalizumab e interferona-gamma.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferona- β 1a (AVONEX; Biogen); interferona- β 1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferona α -n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferona- α (Alfa Wassermann/J&J), interferona β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferona α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos a o antagonistas de otras citoquinas humanas o factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con anticuerpos a moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser combinados con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenilato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosin, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p.e. IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de célula T tales como inhibidores de quinasa,

inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles y derivados de los mismos (p.e., receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p-e., IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

Ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple en los cuales se puede combinar el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo incluyen interferona- β , por ejemplo, IFN β 1a e IFN β 1b; Copaxona, corticosteroides, inhibidores de caspasa, por ejemplo inhibidores de caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos al ligando CD40 y CD80.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser combinados con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposoma), THCCBD (agonista canabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo del receptor anti-IL-6, neurovax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-RI, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas de interferona gamma, agonistas de IL-4.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Angina con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, mononitrato de isosorbida, succinato de metoprolol, atenolol, tartrato de metoprolol, besilato de amlodipina, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, bisulfato de

143
156
158

clopidogrel, nifedipina, atorvastatina cálcica, cloruro de potasio, furosemida, simvastatina, hcl verapamil, digoxin, clorhidrato de propranolol, carvedilol, lisinopril, espironolactona, hidroclorotiazida, maleato de enalapril, nadolol, ramipril, enoxaparin sódico, heparina sódica, valsartan, clorhidrato de sotalol, fenofibrato, ezetimibe, bumetanida, losartan potásico, lisinopril/hidroclorotiazida, felodipina, captopril, fumarato de bisoprolol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Espondilitis anquilosante con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: ibuprofeno, diclofenaco y misoprostol, naproxeno, meloxicam, indometacina, diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Sulfasalazina, Metotrexato, azatioprina, minociclina, prednisona, etanercept, infliximab.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el Asma con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast sódico, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, hcl levalbuterol, sulfato de albuterol/ipratropio, fosfato de prednisolona sódica, triamcinolona acetona, dirpopionato de beclometasona, bromuro de ipatropio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anhidra, succinato de metilprednisolona sódica, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacuna de virus de influenza, metilprednisolona, trihidrato de amoxicilina, flunisolida, infección por alergia, cromolina sódica, clorhidrato de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo de ayuda a la inhalación, guaifenesina, fosfato de dexametasona sódica, hcl moxifloxacina, doxiciclina hclato, guaifenesina/d-metorfan, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, clorhidrato de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato, cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, hcl cetirizine/seudoefed, fenilefrina/cod/prometazina,

144
159

codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/seudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil sódico, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para COPD con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: sulfato de albuterol/ipratropio, bromuro de ipratropio, salmeterol/fluticasona, albuterol, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, prednisona, teofilina anhidra, succinato de metilprednisolona sódica, montelukast sódico, budesonida, fumarato de formoterol, triamcinolona acetona, levofloxacina, guaifenesina, azitromicina, dipriopionato de beclometasona, hcl levalbuterol, flunisolida, ceftriaxona sódica, trihidrato de amoxicilina, gatifloxacina, zafirlukast, amoxicilina/clavulanato, flunisolida/mentol, clorfeniramina/hidrocodona, sulfato de metaproterenol, metilprednisolona, furoato de mometasona, p-efedrina/cod/clorfenir, acetato de pirbuterol, p-efedrina/loratadina, sulfato de terbutalina, bromuro de tiotropio, (R,R)-formoterol, TgAAT, Cilomilast, Roflumilast.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para HCV con los cuales se pueden combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: Interferona-alfa-2a, Interferona-alfa-2b, Interferona-alpha con 1, Interferona-alpha-n1, interferona-alfa-2a pegilada, interferona-alfa-2b pegilada, ribavirina, Peginterferona alfa-2b + ribavirina, Ácido Ursodeoxicólico, Ácido Glicirrónico, Timalfasina, Maxamina, VX-497 u cualquier compuesto que se usa para tratar la HCV mediante la intervención con los siguientes objetivos: polimerasa de HCV, proteasa de HCV, helicasa HCV, IRES HCV (sitio de entrada de ribosoma interno).

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Fibrosis Pulmonar Idiopática con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción

160 745
158

de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: prednisona, azatioprina, albuterol, colchicina, sulfato de albuterol, digoxina, gamma interferona, suc de metilprednisolona sód, lorazepam, furosemida, lisinopril, nitroglicerina, espironolactona, ciclofosfamida, bromuro de ipatropio, actinomicina d, alteplasa, propionato de fluticasona, levofloxacin, sulfato de metaproterenol, sulfato de morfina, hcl oxicodona, cloruro de potasio, triamcinolona acetona, tacrolimus anhidro, calcio, interferona-alfa, metotrexato, micofenilato mofetil, Interferona-gamma-1 β .

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para el Infarto al Miocario con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: aspirina, nitroglicerina, tartrato de metoprolol, enoxaparina sódica, heparina sódica, bisulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina sódica, lisinopril, mononitrato de isosorbida, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplasa, maleato de enalapril, torsemida, retavasa, losartan potásico, hcl quinapril/Carb mag, bumetanida, alteplasa, enalaprilat, clorhidrato de amiodarona, m-hidrato de hcl tirofiban, clorhidrato de diltiazem, captopril, irbesartan, valsartan, clorhidrato de propranolol, fosinopril sódico, clorhidrato de lidocaína, eptifibatida, cefazolin sódico, sulfato de atropina, ácido aminocapróico, espironolactona, interferona, clorhidrato de sotalol, cloruro de potasio, docusato sódico, hcl dobutamina, alprazolam, pravastatina sódica, atorvastatina cálcica, clorhidrato de midazolam, clorhidrato de meperidina, dinitrato de isosorbida, epinefrina, clorhidrato de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimibe/simvastatina, avasimibe, cariporida.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Soriasis con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: inhibidor de molécula pequeña de KDR (ABT-123), inhibidor de molécula pequeña de Tie-2, calcipotrieno, propionato de

clobetasol, triamcinolona acetonida, propionato de halobetasol, tazaroteno, metotrexato, fluocinonida, diprop de betametasona aumentado, fluocinolona acetonida, acitretina, champú de alquitrán, valerato de betametasona, furoato de mometasona, quetoconazol, pramoxina/fluocinolona, valerato de hidrocortisona, flurandrenolida, úrea, betametasona, propionato de clobetasol/emol, propionato de fluticasona, azitromicina, hidrocortisona, formula humectante, ácido fólico, desonida, pimecrolimus, alquitrán de hulla, diacetato de diflorasona, folato de etanercept, ácido láctico, metoxsalen, hc/bismuto subgal/znox/resor, acetato de metilprednisolona, prednisona, pantalla solar, halcinonida, ácido salicílico, antralina, pivalato de clocortolona, extracto de hulla, alquitrán de hulla/ácido salicílico, alquitrán de hulla/ácido salicílico/azufre, desoximetasona, diazepam, emoliente, fluocinonida/emoliente, aceite mineral/aceite de ricino/na lact, aceite mineral/aceite de maní, petróleo/miristrato de isopropilo, soralen, ácido salicílico, jabón/tribromsalano, timerosal/ácido bórico, celecoxib, infliximab, ciclosporina, alefacept, efalizumab, tacrolimus, pimecrolimus, PUVA, UVB, sulfasalazina.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Artritis Soriática con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: metotrexato, etanercept, rofecoxib, celecoxib, ácido fólico, sulfasalazina, naproxeno, leflunomida, acetato de metilprednisolona, indometacina, sulfato de hidroxiclороquina, prednisona, sulindac, diprop de betametasona aumentado, infliximab, metotrexato, folato, triamcinolona acetonida, diclofenaco, dimetilsulfóxido, piroxicam, diclofenaco sódico, cetoprofeno, meloxicam, metilprednisolona, nabumetona, tolmetina sódica, calcipotrieno, ciclosporina, diclofenaco sódico/misoprostol, fluocinonida, sulfato de glucosamina, tiomalato de oro sódico, bitrarrato de hidrocodona/apap, ibuprofeno, risedronato sódico, sulfadiazina, tioguanina, valdecoxib, alefacept, efalizumab.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la Restenosis con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: sirolimus, paclitaxel, everolimus, tacrolimus, ABT-578, acetaminofén.

Ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para la ciática con los cuales se puede combinar un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: bitratarato de hidrocodona/apap, rofecoxib, hcl ciclobenzaprina, metilprednisolona, naproxeno, ibuprofeno, hcl oxicodona/acetaminofén, celecoxib, valdecoxib, acetato de metilprednisolona, prednisona, fosfato de codeína/apap, hcl tramadol/acetaminofén, metaxalona, meloxicam, metocarbamol, clorhidrato de lidocaína, diclofenaco sódico, gabapentina, dexametasona, carisoprodol, trometamina de ketorolac, indometacina, acetaminofén, diazepam, nabumetona, hcl oxicodona, hcl tizanidina, diclofenaco sódico/misoprostol, napsilato de propoxifeno/apap, asa/oxicod/oxicodona ter, ibuprofeno/bit de hidrocodona, hcl de tramadol, etodolac, hcl propoxifeno, hcl amitriptilina, carisoprodol/fos de codeína/asa, sulfato de morfina, multivitaminas, naproxeno sódico, citrato de orfenadrina, temazepam.

Ejemplos preferidos de los agentes terapéuticos para SLE (Lupus) en los cuales se puede combinar un anticuerpo o porción de unión a antígeno incluyen los siguientes: NSAIDS, por ejemplo, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, piroxicam, indometacina; inhibidores de COX2, por ejemplo, Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib; anti-malariales, por ejemplo, hidroxiclороquina; esteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, budenosida, dexametasona; Citotóxicos, por ejemplo, azatioprina, ciclofosfamida, micofenilato mofetil, metotrexato; inhibidores de PDE4 o inhibidor de la síntesis de purina, por ejemplo Cellcept. Los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos, también pueden ser

148
161
167

combinados con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, Imuran y agentes que interfieren con la síntesis, producción o acción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de caspasa como inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β y IL-1ra. Los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar con inhibidores de señalización de célula T, por ejemplo, inhibidores de torisina quinasa; o moléculas que marcan moléculas de activación de célula T, por ejemplo, anticuerpos de la familia CTLA-4-IgG o anti-B7, anticuerpos de la familia anti-PD-1. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con IL-11 o anticuerpos anti-citoquina, por ejemplo, fonotolizumab (anticuerpo anti-IFNg), o anticuerpos del receptor anti-receptor, por ejemplo, anticuerpo del receptor anti-IL-6 y anticuerpos a moléculas de superficie de célula B. Los anticuerpos de la invención o porción de unión a antígeno de los mismos también se pueden usar con agentes LJP 394 (abetimus), agentes que repleta o inactiva las células B, por ejemplo, Rituximab (anticuerpo anti-CD20), linfostar-B (anticuerpo anti-BlyS), anticuerpos de TNF, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, D2E7 (Publicación PCT No. WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, contrucciones de TNFR-Ig, (p75TNFR-IgG (ENBREI) y p55TNFR-IgG (LENERCEPT)).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser determinada por un experto en la técnica, y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la habilidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para

producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, o porción de anticuerpo, es compensado por los efectos terapéuticos benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en un estado temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosis pueden ser ajustados para proveer la respuesta deseada óptima (p.e., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis en el tiempo, o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o aumentada según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente conveniente formular composiciones parenterales en forma de dosis unitarias para facilidad de administración y uniformidad de dosis. La forma de dosificación unitaria, como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidades de dosis de la invención es dictada por, y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de compuestos, tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la

160
163
165

invención es 0.1-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg. También se notará que los valores de dosis pueden variar It is to be noted that dosage con el tipo y severidad de la condición a ser aliviada. Se entenderá adicionalmente que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosis establecidos aquí son solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada. Será fácilmente obvio para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos aquí son obvias y se pueden hacer usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las realizaciones reveladas aquí. Habiendo ahora descrito la presente invención en detalle, la misma será entendida más claramente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que están incluidos para propósitos de ilustración solamente y no pretender ser limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y aislamiento de anticuerpos anti IL-12 humana monoclonales

Ejemplo 1.1: Ensayos para identificar anticuerpos anti IL-12 humana

A lo largo del Ejemplo 1 se usaron los siguientes ensayos para identificar y caracterizar los anticuerpos anti IL-12 humana a menos que se declare de otra forma.

181
104
166**Ejemplo 1.1 A: ELISA**

Los ensayos Inmunosorbentes Ligados a Enzima para seleccionar anticuerpos que se unen a la IL-12 humana se realizaron de la siguiente forma.

Ejemplo 1.1 A.1: ELISA para detectar la unión de anticuerpos anti IL-12 humana a IL-12 p70

Se recubrieron placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) con 50 μ L/pozo de 5 μ g/ml de Fc específico de IgG anti-ratón de cabra (Pierce # 31170, Rockford, IL.) en Solución Salina Amortiguada con Fosfato (PBS) durante la noche a 4 grados Celsius. Las placas fueron lavadas una vez con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Las placas fueron bloqueadas mediante la adición de 200 μ L/pozo de solución bloqueadora hasta 2% en PBS (BioRad #170-6404, Hercules, CA.) por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas una vez después de bloquear con PBS que contiene 0.05% de Tween-20.

Se agregaron cincuenta microlitros por pozo de suero de ratón o sobrenadantes de hibridoma diluidos en PBS que contiene 0.1% de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (Sigma, St. Louis, MO.) a la placa de ELISA preparada como se describió anteriormente, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se agregaron cincuenta microlitros de IL12 p70 humana purificada recombinante biotinilada diluida hasta 100 ng/mL en PBS que contiene 0.1% de BSA a cada pozo y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se diluyó Estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ L/pozo y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las

182
165
167

placas fueron lavadas 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se agregaron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO.) a cada agujero y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo 1.1.A.2: ELISA para evaluar la habilidad de IL-12 p70 o IL-12 p40 para competir con la unión de los anticuerpos anti IL-12 humana a IL-12 p70

Se recubrieron placas de ELISA (Corning Costar, Acton, MA) con 50 μ L/pozo de 5 μ g/ml de Fc específico de IgG anti-ratón de cabra (Pierce # 31170, Rockford, IL.) en PBS durante la noche a 4 grados Celsius. Las placas fueron lavadas una vez con PBS+ 0.05% de Tween-20. Las placas fueron bloqueadas mediante la adición de PBS + 10% de leche en polvo por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces después del bloqueo con PBS+ 0.05% de Tween-20.

Ejemplo 1.1.A 2(a): Protocolo de ELISA de competición a IL-12 p70

Suero de ratón o sobrenadantes de hibridoma se diluyeron en PBS que contiene 0.1% de BSA (Sigma, St. Louis, MO.) dependiendo del título de anticuerpo anticipado. La IL-12 p70 humana purificada recombinante biotinilada se preparó como una solución patrón tres veces concentrada (3x) a 0.1 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA. La IL-12 p70 humana purificada recombinante se preparó a diferentes concentraciones que varían de 0.1 a 10 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA. Se mezclaron iguales volúmenes (75 μ L) de cada una de las siguientes soluciones: suero de ratón diluido o sobrenadante de hibridoma, IL-12 p70 humana purificada recombinante biotinilada, y IL-12 p70 humana purificada recombinante. Se agregaron

153
~~166~~
168

cincuenta microlitos de esta mezcla a las placas de ELISA recubiertas descritas anteriormente, y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se diluyó Estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ L/pozo y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS wqur contiene 0.05% de Tween-20. Se agregaron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO.) a cada pozo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo 1.1.A 2(b): Protocolo de ELISA de competición a IL-12 p40

Suero de ratón o sobrenadantes de hibridoma se diluyeron en PBS que contiene 0.1% de BSA (Sigma, St. Louis, MO.) dependiendo del título de anticuerpo anticipado. La IL-12 p70 humana purificada recombinante biotinilada se preparó como una solución patrón tres veces concentrada (3x) a 0.1 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA. La IL-12 p40 humana purificada recombinante se preparó a diferentes concentraciones que varían de 0.1 a 10 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA. Se mezclaron iguales volúmenes (75 μ L) de cada una de las siguientes soluciones: suero de ratón diluido o sobrenadante de hibridoma, IL-12 p70 humana purificada recombinante biotinilada, y IL-12 p40 humana purificada recombinante. Se agregaron cincuenta microlitos de esta mezcla a las placas de ELISA recubiertas y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se diluyó Estreptavidina HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ L/pozo y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS wqur

154
169

contiene 0.05% de Tween-20. Se agregaron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO.) a cada pozo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 1N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

Ejemplo 1.1.B: Determinaciones de Afinidad usando Tecnología BIACORE

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de constantes de velocidad de rango encendido y apagado (on, off). La unión de los anticuerpos a IL-12 p70 humana purificada recombinante o IL-12 p40 humana purificada recombinante se determinó por mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando HBS-EP de corrida (HEPES 10 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y 0.005% de surfactante P20) a 25 °C. Todos los químicos se obtuvieron en Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra forma de diferentes fuentes como se describe en el texto. Aproximadamente 5000 RU de IgG anti-ratón de cabra, (Fcγ), anticuerpo policlonal específico de fragmento (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) fue directamente inmovilizado a lo largo de un chip biosensor de grado de investigación CM5 usando un kot de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con las instrucciones y procedimientos del fabricante a 25 µg/ml. Las mitades sin reaccionar en la superficie del biosensor fueron bloqueadas con etanolamina. Se usó superficie de carboximetil dextrano modificado surface en la celda de flujo 2 y 4 como una superficie de reacción. Se usó carboximetil dextrano no modificado sin IgG anti-ratón de cabra en la celda de flujo 1 y 3 como la superficie de referencia. Para el análisis cinético, las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 fueron ajustadas

285
168
770

simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste global) con el uso del software Biaevaluation 4.0.1. Los anticuerpos purificados fueron diluidos en solución salina amortiguada con HEPES para la captura a lo largo de las superficies de reacción de IgG anti-ratón de cabra. Los anticuerpos de ratón a ser capturados como un ligando (25 µg/ml) fueron inyectados sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Se determinaron las constantes de velocidad asociación y disociación, k_{on} (unidad $MT^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}) bajo una velocidad de flujo constante de 25 µl/min. Las constantes de velocidad se derivaron haciendo mediciones de unión cinética a diez concentraciones de antígeno diferentes que varían de 10 - 200 nM. La constante de disociación en equilibrio (unidad M) de la reacción entre los anticuerpos de ratón y IL-12 p70 humana purificada recombinante o IL-12 p40 humana purificada recombinante fue entonces calculada a partir de las constantes de velocidad cinética mediante la siguiente formula: $K_D = k_{off}/k_{on}$. La unión se registra como una función de tiempo y se calculan las constantes de velocidad cinética. En este ensayo, se pueden medir velocidades on tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y velocidades off tan lentas como $10^{-6} s^{-1}$.

Ejemplo 1.1.C: Actividad Funcional de los anticuerpos anti IL-12 humana

Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos anti-IL-12 humana de la invención, se usaron los anticuerpos en los siguientes ensayos que miden la habilidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-12.

Ejemplo 1.1.C1: Preparación de Linfoblastos Activados por PHA Humana

156
1/4
121

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) de un leucopac recolectado de un donador saludable mediante centrifugación por gradiente Ficoll-Hypaque por 45 minutos a 1500 rpm como se describe en Current Protocols in Immunology, Unit 7.1. Se recolectó PBMC en la interfaz de la solución de sangre acuosa y el medio de separación de linfocito y se lavaron tres veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) mediante centrifugación por 15 minutos a 1500 rpm para remover las partículas Ficoll-Paque.

Las PBMC fueron entonces activadas para formar linfoblastos como se describe en Current Protocols in Immunology, Unit 6.16. Las PBMC lavadas fueron resuspendidas a $0.5 - 1 \times 10^6$ células/mL en medio RPMI completo (medio RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 tg/ml de estreptomycin), complementado con 0.01 mg/mL de PHA-P (Sigma #L8754, St. Louis, MO) y se cultivaron por 4 días a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de cuatro días, los cultivos celulares fueron entonces re-sembrados a 1×10^6 células/mL en medio de cultivo con 0.01mg/mL de PHA-P y 50U/mL de IL-2 humana recombinante (R&D Systems #202-EL, Minneapolis, MN.). Las células fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, lavadas con medio de RPMI completo, luego congeladas en 95% de FBS, 5% de DMSO a 1×10^7 células/ml.

Ejemplo 1.1.C 2: Ensayo de Inducción de IFN- γ por Blasto de PHA:
Inhibición de la actividad de IL-12 humana

La habilidad de los anticuerpos anti-IL-12 humana para inhibir la producción de IFN- γ inducida por IL-12 humana mediante blastos de PHA se analizó de la siguiente forma. Varias concentraciones de suero de ratón inmunizado, sobrenadante de hibridoma murino o anticuerpos anti-IL-12 humana purificados fueron preincubados por una hora a 37 grados C con 400

157
140
172

pg/ml de IL-12 p70 humana purificada recombinante en 100 μ L de medio RPMI completo en una placa microtituladora (fondo en U, 96 pozos, Costar). Los blastos de PHA aislados como se describió anteriormente, fueron lavados una vez y resuspendidos en medio RPMI completo a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. Se agregaron blastos de PHA (100 μ L de 1×10^6 células/ml) a mezcla de anticuerpo más IL-12 p70 humana purificada recombinante (la concentración final de IL-12 p70 fue de 200 pg/ml) y se incubaron por 18 horas a 37 grad. C. Después de la incubación, 150 μ L de sobrenadante libre de célula fueron retirados de cada pozo y se midió el nivel de IFN- γ humana producida usando una ELISA de IFN- γ humana (R&D Systems Cat#DIF50).

Ejemplo 1.1.C 3: Ensayo de inducción de IFN- γ por blasto de PHA:
Inhibición de la actividad de IL-12 de mico cynomolgus
(cyno)

La habilidad de los anticuerpos anti-IL-12 humana para inhibir la producción de IFN-g inducida por IL-12 de mico cynomolgus mediante blastos de PHA se analizó de la siguiente forma. Varias concentraciones de suero de ratón inmunizado, sobrenadante de hibridoma murino o anticuerpos anti-IL-12 humana purificados fueron preincubados por una hora a 37 grados C con 150 pg/mL de IL-12 p70 cyno purificado recombinante en 100 μ L de medio RPMI completo en una placa microtituladora (fondo en U, 96 pozos, Costar). Los blastos de PHA aislados como se describió anteriormente, fueron lavados una vez y resuspendidos en medio RPMI completo a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. Se agregaron Blastos de PHA (100 μ L de 1×10^7 células/mL) a la mezcla de anticuerpo más IL-12 p70 cyno purificado recombinante (concentración final de IL-12 p70 cyno era de 75 μ g/ml) y se incubaron por 18 horas a 37 grad C. Después de la incubación, 150 μ L de sobrenadante libre de

188
177

célula fueron retirados de cada pozo y se midió el nivel de IFN- γ humana producida usando una ELISA humana (R&D Systems Cat#DJF50).

Ejemplo 1.2: Generación de anticuerpos monoclonales Anti IL-12 humana

Se obtuvieron anticuerpos Anti IL-12 humana monoclonales de ratón de la siguiente forma:

Ejemplo 1.2.A: Inmunización de ratones con antígeno de IL-12 humana

Se inyectaron subcutáneamente veinte microgramos de IL-12 p70 humana purificada recombinante mezclados con adyuvante de Freund completo (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) en cinco ratones Balb/C y 5 AJ de 6-8 semanas de edad en el Día 1. En los días 24, 38, y 49, se inyectaron subcutáneamente veinte microgramos de IL-12 p70 humana purificada recombinante mezclada con adyuvante de Inmunoensayo (Qiagen, Valencia, CA) en los mismos 5 ratones Balb/C y 5 AJ. En el día 84 o día 112 o día 144, los ratones fueron inyectados intravenosamente con 10 ug de IL-12 p70 humana purificada recombinante o 2ug de IL-12 p40 humana purificada recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Ejemplo 1.2.B: Generación de Hibridoma

Esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados descritos en el Ejemplo 1.2. A se fusionaron con células SP2/O-Ag-14 a una relación de 5:1 de acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión fueron colocados en placas en medios de selección que contienen azaserina y hipoxantina en placas de 96 pozos a una densidad de 2.5×10^6 células del bazo por pozo. Siete a diez días después de la fusión se observaron las colonias de

189
174

hibridomas macroscópicas. El sobrenadante de cada pozo que contiene colonias de hibridoma fue evaluado por ELISA para la presencia del anticuerpo a IL-12 p70 (como se describe en el Ejemplo 1.1.A.1). Los sobrenandantes evaluados positivos para la unión a IL-12 p70 fueron entonces evaluados para determinar si eran específicos de p40 mediante el ensayo de competición De ELISA a IL-12 p70 o IL-12 p40 (como se describe en el Ejemplo 1.1.A.2). Los sobrenadantes que muestran actividad específica de IL-12 p40 fueron entonces evaluados para la habilidad de neutralizar IL-12 en el ensayo de blasto de PHA para IFN- γ (como se describe en el Ejemplo 1.1.C).

Tabla 8: Datos de fusión y selección después de las inmunizaciones de ratones con IL-12 humana

Cepa de ratón usada en la fusión	Número de pozos en placa	Número de pozos con crecimiento	Número de clones anti-IL-12	Número de clones específicos de p40	Número de clones neutralizantes de p40	Número de clones subclonados
A/J-2	750	450	50	14	6	4
A/J-5	650	300	20			
Balb/C-3	480	457	50	13	6	5
Balb/C-4	768	649	25	17	13	4
Total	2648	1856	145	44	25	13

Ejemplo 1.2.C: Identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti IL-12p40 humana

Hibridomas que producen anticuerpos que se unen a IL-12, generados de acuerdo con los Ejemplos 1.2.B y 1.2.C, y capaces de unirse a IL-12 p40 específicamente y particularmente aquellos con valores de IC₅₀ en el ensayo de blasto de PHA de 12nM o menor de 12nM fueron escalados y clonados mediante dilución limitante.

160
125
175

Las células de hibridoma fueron expandidas en medio que contiene 10% de suero bovino fetal IgG bajo (Hyclone #SH30151, Logan, UT.). En promedio, se cosecharon 250 mL de cada sobrenadante de hibridoma (derivado de una población clonal), se concentraron y purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A, como se describe en Harlow, E. y Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". Se determinó la habilidad de los mAbs purificados para inhibir la actividad de IL-12 usando el ensayo de blasto de PHA como se describe en los Ejemplos 1.1.C 2 y 1.1.C3. La tabla 9 muestra los valores de IC₅₀ de los ensayos de blasto de PHA para diez anticuerpos monoclonales.

Tabla 9: Neutralización de IL-12 por Anticuerpos Monoclonales anti IL-12p40 Murinos

Anticuerpo Monoclonal Murino	IC ₅₀ promedio (nM) IL-12 Humana	IC ₅₀ promedio (nM) IL-12 Cyno
1D4	0.031	0.078
1A6	0.052	0.044
1D8	0.31	1.4
3G7	0.15	0.35
5E8	12	N/D
8E1	0.19	0.18
1H6	0.69	1.6
3A11	3.4	N/D
4B4	0.039	0.028
7G3	0.047	>20

Las afinidades de enlace de los anticuerpos monoclonales a IL-12 p70 humana purificada recombinante se determinaron usando medida de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo

1.1.B. La Tabla 10 muestra la afinidad de los diez anticuerpos monoclonales descritos para IL-12 p70 humana.

Tabla 10: Afinidad de Anticuerpos Monoclonales anti IL-12p40 Murinos para IL-12 p70

Nombre	k_{on} (1/m·s)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
1D4	2.5×10^5	2.9×10^{-5}	0.12
1A6	1.5×10^5	3.5×10^{-5}	0.23
1D8	5.1×10^5	2.3×10^{-5}	0.044
3G7	8.2×10^5	3.8×10^{-5}	0.047
5E8	5.7×10^5	2.3×10^{-3}	4
8E1	6.9×10^5	5.1×10^{-5}	0.074
1H6	4.3×10^5	9.9×10^{-5}	0.25
3A11	1.5×10^5	1.9×10^{-4}	1.2
4B4	1.3×10^5	1.4×10^{-5}	0.1
7G3	1.1×10^6	2.8×10^{-4}	0.27

**Ejemplo 1.2.C.1: Especificidad de Especie de los anticuerpos Species
Specificity of murine monoclonal anti-IL-12p40 humana
monoclonales murinos**

Para determinar si los diez anticuerpos monoclonales descritos anteriormente reconocen IL-12 murina, se ajustaron dos ELISAs. Primero, se ajustó una ELISA directa recubriendo directamente placas de ELISA con 5 ug/ml de IL-12 de ratón purificada recombinante (Peprotech). Los mAbs anti-IL-12 p40 humana murinos se prepararon a diferentes concentraciones que varían de 3 a 200 ng/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA (Sigma, StLouis, MO). Se agregaron 50 µl de cada dilución de anticuerpo a la placa de ELISA recubierta y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. El anticuerpo IgG-

HRP anti-ratón (R&D #HAF007, Minneapolis, MN) fue diluido 1:2000 en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ l/pozo y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Se agregaron cincuenta microlitros de solución de TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO.) a cada pozo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 2N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm.

Segundo, se ajustó una ELISA indirecta recubriendo placas de ELISA con 5 μ g/ml de IgG anti-ratón de cabra, anticuerpo específico del fragmento Fc (Pierce # 31170, Rockland, IL). Los MABs anti-IL-12 p40 humana murinos se prepararon a diferentes concentraciones que varían de 0.1 a 100 ng/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA; Se agregaron 50 μ l de cada dilución de anticuerpo a la placa de ELISA recubierta y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. La IL-12 de ratón purificada recombinante (Preprotech) se diluyó a 0.2 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ l/pozo y las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. El anticuerpo anti-IL-12 de ratón biotinilado (R&D # BAF419) se diluyó a 0.2 μ g/ml en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ l/pozo y las placas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se diluyó HRP estreptavidina (Pierce # 21126, Rockland, IL.) 1:20000 en PBS que contiene 0.1% de BSA; se agregaron 50 μ L/pozo y las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween-20. Se agregaron cincuenta microlitros de solución de TMB a cada pozo y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 2N. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados

163
178

de las ELISA directa e indirecta realizadas con los diez anticuerpos monoclonales se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Unión de Anticuerpos Murinos Monoclonales anti IL-12 a IL-12 p40 de ratón

Nombre	ELISA directa Unión de mAB a IL-12 mu	ELISA indirecta Unión de mAB a IL-12 mu
1D4	No	N/D
1A6	No	N/D
1D8	No	No
3G7	No	No
5E8	No	No
8E1	No	No
1H6	No	No
3A11	No	No
4B4	No	N/D
7G3	No	N/D

Ejemplo 1.2.D: Determinación de la secuencia de amino ácido de la región variable para cada mAb murino anti-IL-12 p40 humana

Para cada determinación de secuencia de amino ácido, se aislaron aproximadamente 10 x 10⁶ células de hibridoma mediante centrifugación y se procesaron para aislar el ARN total con Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue sometido síntesis de ADN de primera cadena usando el Sistema de Síntesis de Primera Cadena Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Se usó Oligo(dT) para cebar la síntesis de la primera cadena para

seleccionar para ARN poli(A)⁺. El producto de cADN de primera cadena fue entonces amplificado mediante PCR con cebadores diseñados para amplificación de regiones variables de inmunoglobulina murina (Conjuntos de Cebador Ig, Novagen, Madison, WI). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa, extirpado, purificado, y luego subclonado con el Kit de clonación TOPO en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transformó en *E. coli* químicamente competente TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La PCR de colonia se realizó sobre los transformantes para identificar clones que contienen el inserto. El ADN plásmido fue asilado de clones que contienen el inserto usando un kit QIAprep Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA). Los insertos en los plásmidos fueron secuenciados en ambas cadenas para determinar las secuencias de ADN de cadena ligera variable o pesada variable usando los cebadores M13 delantero y M13 reverso (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Las secuencias de cadena ligera variable y pesada variable de los diez anticuerpos monoclonales descritos en el Ejemplo 1.2.C se describen en la Tabla 1.

Ejemplo 2: Anticuerpos anti IL-12p40 humana recombinantes

Ejemplo 2.1: Construcción y expresión de anticuerpos anti-IL12 humana quiméricos recombinantes

El ADN que codifica la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales anti-IL-12p40 humana murinos 3G7, 8E1, 1A6, y 1D4 fue reemplazado con fragmento de cADN que codifica la región constante IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de amino ácido de región bisagra mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de posición de leucina a alanine en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región constante de cadena ligera de cada uno de estos

anticuerpos fue reemplazada por una región constante kappa humana. Los anticuerpos quiméricos de longitud total fueron expresados temporalmente en células COS mediante co-transfección de cADNs de cadena ligera y pesada quiméricos ligados en el plásmido de expresión de pBOS (Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322) que comprende una secuencia de señal de cadena pesada MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID NO. 110), y una secuencia de señal de cadena ligera MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRC ((SEQ ID NO. 111).

Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpo quimérico recombinante fueron purificados mediante Cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo enlazado fue eluido por la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron neutralizados y dializados en PBS.

El cADN de cadena pesada que codifica 3G7 quimérico (descrito anteriormente) fue co-transfectado con el cADN de cadena ligera quimérica 1D4 (ambos ligados en el vector pBOS) en células COS. El sobrenadante de célula que contiene anticuerpo quimérico recombinante fue purificado mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo enlazado fue eluido por la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron neutralizados y dializados en PBS.

Los anticuerpos monoclonales anti-IL-12 humana quiméricos purificados fueron entonces probados para su habilidad para inhibir la producción de IFN- γ inducida por IL-12 por blastos de PHA como se describe en los Ejemplos 1.1.C 2 y 1.1.C3. La Tabla 12 muestra los valores de IC₅₀ de los ensayos de blasto de PHA para los cinco anticuerpos quiméricos.

166
181
PA

Tabla 12: Neutralización de IL-12 por Anticuerpos anti IL-12 Quiméricos

Nombre del Quimérico	IC ₅₀ promedio (nM) IL-12 Humana	IC ₅₀ promedio (nM) IL-12 cyno
1D4-Quim	0.021	0.07
1A6-Quim	0.021	0.02
3G7-Quim	0.12	0.32
8E1-Quim	0.17	0.15
3G7/1D4-Quim	0.11	0.29

Ejemplo 2.2:Construcción y expresión de anticuerpos anti IL-12p40 humana con CDR injertada

Los anticuerpos anti-IL- 12 humana con CDR injertada se generaron de la siguiente forma.

Ejemplo 2.2.1 Selección de marcos de anticuerpo humano

Cada secuencia de gen de cadena ligera variable y pesada variable murino (como se describe en la Tabla 3) fue alineada separadamente contra 44 secuencias de cadena pesada variable de línea germinal de inmunoglobulina humana o 46 secuencias de cadena ligera variable de línea germinal (derivadas del sitio NCBI Ig Blast website en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.) usando el software Vector NTI. Secuencias de dominio variable humano que tienen la más alta homología global a las secuencias murinas originales (así como la más alta homología en las posiciones que se conoce que son importantes para la unión a antígeno) (Welschof, M. y Krauss, J. Methods In Molecular Biology, Vol 207) fueron seleccionadas para cada secuencia de cadena pesada y cadena ligera para proveer las secuencias de marco (FW) 1, 2 y 3 para propósitos de inserción de CDR. La identificación de una región FW4 de cadena ligera y pesada variable

humana adecuada (también conocida como la región de "unión") se realizó alineando separadamente cada región FW4 de cadena pesada y cadena ligera murina con 6 secuencias de cadena pesada que unen la línea germinal de inmunoglobulina humana y 5 secuencias de cadena ligera que unen línea germinal en la base de datos NCBI. *In silico* la construcción de anticuerpos injertados con CDR completos se realizó mediante sustitución de secuencias de CDR de dominio variable humano (derivadas del sitio en la red NCBI) con secuencias de CDR murinas (derivadas de los hibridomas) con adición de una región FW4 (derivada del sitio en la red NCBI) en cada extremo 3'.

Ejemplo 2.2.2: Construcción de anticuerpos de CDR injertada

Los anticuerpos de CDR injertada contruidos *in silico* descritos anteriormente se construyeron de novo usando oligonucleótidos. Para cada cADN de región variable, se diseñaron 6 oligonucleótidos de 60-80 nucleótidos cada uno para superponerse entre sí en 20 nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de cada oligonucleótido. En una reacción de fijado, los 6 oligos fueron combinados, ebullicos, y fijados en la presencia de dNTPs. Luego se agregó la Polimerasa I de ADN, fragmento grande (Klenow) (New England Biolabs #M0210, Beverley, MA.) para llenar en espacios de aproximadamente 40bp entre los oligonucleótidos de superposición. Luego se realizó PCR para amplificar el gen de región variable entero usando los dos cebadores del extremo último que contienen secuencias sobresalientes complementarias al sitio de clonación múltiple en un vector pBOS modificado (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)).

Los productos de PCR derivados de cada ensamble de cADN fueron separados en un gel de agarosa y la banda correspondiente al tamaño de cADN de región variable predicha fue extirpada y purificada. La región pesada variable fue insertada en-marco en un fragmento de cADN que codifica la

región constante de IgG1 humana que contiene 2 mutaciones de amino ácido de región bisagra (SEQ ID NO. 3) mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en la posición 234 (numeración EU) y un cambio de leucina a alanina en la posición 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). La región variable de cadena ligera fue insertada en-marco con la región contante kappa humana (SEQ ID NO. 4) mediante recombinación homóloga. Las colonias bacterianas fueron aisladas y el ADN plásmido se extrajo; los insertos de cADN fueron secuenciados en su totalidad. Las cadenas pesada y ligera de CDr injertada correctas correspondientes a cada anticuerpo fueron co-transfectadas en células COS para producir temporalmente anticuerpos anti-IL-12 humana de CDR injertada de longitud total. Para 1A6, los vectores pBOS que contienen el cADN injertado de cadena pesada de 1A6 y el cADN injertado de cadena ligera de 1D4 fueron co-transfectados en células COS (la secuencia de cadena ligera de 1A6, cuando fue injertada, era idéntica a la secuencia de cadena ligera de 1D4). Los sobrenadantes de célula que contienen el anticuerpo quimérico recombinante fueron purificados mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo enlazado fue eluido por la adición de amortiguador ácido. Los anticuerpos fueron neutralizados y dializados en PBS. Nueve anticuerpos de CDR injertada se describen en la Tabla 5.

La habilidad de los anticuerpos de CDR injertada para inhibir la actividad de IL-12 se determinó usando el ensayo de blasto de PHA como se describe en los Ejemplos 1.1.C 2 y 1.1.C3. Las afinidades de enlace de los anticuerpos de CDR injertada purificados a IL-12p70 humana purificada recombinante se determinaron usando medición de resonancia de plasmón superficial (Biacore®) como se describe en el Ejemplo 1.1. B. La Tabla 13 muestra los valores de IC₅₀ de los ensayos de blasto de PHA y la afinidad de los nueve anticuerpos de CDR injertada se describe en la Tabla 7 para IL-12p70 humana y IL-12p70 cynomolgous.

169
184

Tabla 13: Neutralización de IL-12 por Anticuerpos anti IL-12p40 de CDR injertada y Afinidad de anticuerpos anti IL-12p40 de CDR injertada para IL-12p70 humana y cynomolgous y

Anticuerpo de CDR injertada Anti IL-12p40	1D4.1	1D4.2	1D4.3	1A6.1	1A6.2
Velocidad on (1/M·s)	2.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	2.1 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
Velocidad off (1/M·s)	2.9 x 10 ⁻⁵	2.6 x 10 ⁻⁴	5.3 x 10 ⁻⁵	2.9 x 10 ⁻⁵	5.4 x 10 ⁻⁵
K _D (nM)	0.12	1.7	0.25	0.27	0.54
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 hum	0.47	3	0.83	0.48	1.1
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 cyno	1.5	3	1.6	0.57	0.84

Anticuerpo de CDR injertada Anti IL-12p40	8E1.1	8E1.2	3G7.1	3G7.2	1A6.5	1A6.6
Velocidad on (1/M·s)	5.2 x 10 ⁵	0	4.2 x 10 ⁵	6.1 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵
Velocidad off (1/M·s)	8.7 x 10 ⁻⁴	0	9.1 x 10 ⁻⁵	1.4 x 10 ⁻⁴	5.6 x 10 ⁻⁵	1.0x 10 ⁻⁴
K _D (nM)	1.7	0	0.22	0.23	0.43	0.078
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 hum	2.8	0	0.56	0.24	1.9	0.59
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 cyno	4.6	0	1.2	0.7	1.1	0.14

226
178
185**Ejemplo 2.3: Construcción de Anticuerpos anti IL-12 humana humanizados**

La humanización de los anticuerpos anti IL-12 humana se realizó de la siguiente forma.

Ejemplo 2.3.1: Modelamiento de homología con anticuerpos de CDR injertada

Se usó el modelamiento de homología para identificar residuos únicos para las secuencias de anticuerpo murino que se predice que son críticos para la estructura del sitio de combinación del anticuerpo (las CDRs).

El modelamiento de homología es un método computacional por medio del cual se generan coordenadas tridimensionales apropiadas para una proteína. La fuente de coordenadas iniciales y guía para su refinamiento adicional es una segunda proteína, la proteína preferida, para la cual se conocen las coordenadas tridimensionales y la secuencia de la cual está relacionada a la secuencia de la primera proteína. La relación entre las secuencias de las dos proteínas se usa para generar una correspondencia entre la proteína de referencia y la proteína para la cual se desean las coordenadas, la proteína objetivo. Las secuencias primarias de la referencia y las proteínas objetivo son alineadas con coordenadas de porciones idénticas de las dos proteínas transferidas directamente de la proteína de referencia a la proteína objetivo. Las coordenadas para las porciones no emparejadas de las dos proteínas, p.e., de mutaciones, inserciones, o eliminaciones de residuo, son construidas a partir de moldes estructurales genéricos y se refinó la energía para asegurar la consistencia con las coordenadas del modelo ya transferidas. Esta estructura de proteína computacional puede además ser refinada o empleada directamente en estudios de modelamiento. Se debe aclarar de esta descripción que la

237
184
186

calidad de la estructura del modelo es determinada por la precisión de la contención con la que las proteínas de referencia y objetivo están relacionadas y la precisión con la cual la alineación de secuencia está construída.

Para las secuencias murinas 1A6, 8E1 y 1D4, se usó una combinación de búsqueda BLAST e inspección visual para identificar estructuras de referencia adecuadas. Las estructuras de referencia elegidas para 1A6 y 1D4 fue la entrada IJRH de PDB. Para 8E1, la estructura de referencia de cadena pesada fue la entrada 1FL3 de PDB y la referencia de cadena ligera fue 1MEX. La identidad de secuencia de 25% entre las secuencias de amino ácido de referencia y objetivo se considera la mínima necesaria para intentar un ejercicio de modelamiento de homología. Las alineaciones de secuencia se construyeron manualmente y las coordenadas del modelo se generaron con el programa Jackal (ver Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernytsky, A., Schlessinger, A., et al. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* 53 (Suppl. 6): 430-435).

Las secuencias primarias de las regiones marco murina y humana de los anticuerpos seleccionados comparten identidad significativa. Las posiciones de residuo que difieren son candidatas para inclusión del residuo murino en la secuencia humanizada con el fin de retener la potencia de enlace observada del anticuerpo murino. Una lista de residuos de marco que difieren entre las secuencias humana y murina se construyó manualmente.

La probabilidad que un residuo de marco dado impacte las propiedades de unión del anticuerpo depende de su proximidad a los residuos de CDR. Por lo tanto, usando estructuras del modelo, los residuos que difieren entre las secuencias murina y humana fueron clasificados de acuerdo a su distancia

195
187

desde cualquier átomo en las CDRs. Aquellos residuos que caen dentro de los 4.5 Å de cualquier átomo de la CDR fueron identificados como los más importantes y se recomendaron como candidatos para retención del residuo murino en el anticuerpo humanizado (p.e. retro mutación).

El examen del modelo por computadora sugirió que en el anticuerpo 1A6.1, los residuos L1, L2, L36, y L67 de la cadena ligera (1D4.1 VKB3) están en contacto significativo con las CDRs y por lo tanto, sugiere que los residuos murinos deben ser retenidos en estas posiciones. En el caso de 1D4.1, los residuos H1 y H98 de la cadena pesada (1D4.1 VH2-70), así como L2 y L67 de la cadena ligera (1D4.1 VKB3) fueron identificados como posiciones para retro mutación.

Ejemplo 2.3.2: Generación de Anticuerpos híbridos

Para determinar cual cadena de CDR injertada (VH, VL o ambas) puede beneficiarse de retro mutaciones de marco, se construyeron anticuerpos "híbridos" emparejando una cadena H o L con CDR injertada con una cadena H o L murina quimérica apropiada seguida por co-transfección en células COS. La Tabla 14 muestra las secuencias de amino ácido de VH y VL de los anticuerpos híbridos 1A6.3, 1A6.4, 1A6.7, 1A6.8, 1D4.4, y 1D4.5.

Tabla 14: Secuencias de Amino ácido de anticuerpos híbridos

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
69	VH de 1A6.3	
(10)	(FR1 VH2-26/JH6)	EVTLKESGPVLVKPTETLTTLTCTVSGFSLS
(7)	(FR2 VH2-70/JH6)	TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY
(11)	(FR3 VH2-26/JH6)	YNPSLKSR LTISKDTSKSQVLTMTNMDPV
(9)	(FR4 VH2-70/JH6)	DTATYYCARR TRVNYAMDYWGQGT TVTVSS

183
186
188

38	VL de 1A6.3	SVVMTQTPKFLLVSAGDRVTTITCKASQSVS NDVAWFQOKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQ DYNSPWTFGGGKLEIKR
37	VH de 1A6.4	QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSL TSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLRIATVDTA DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTSTVTVSS
70 (27) (28) (29) (26)	VL de 1A6.4 (FR1 L2/JK4) (FR2 L2/JK4) (FR3 L2/JK4) (FR4 B3/JK4)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVS NDVAWYQOKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQ DYNSPWTFGGGKVEIKR
37	VH de 1A6.7	QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSL TSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLRIATVDTA DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTSTVTVSS
68 (23) (24) (25) (26)	VL de 1A6.7 (FR1 B3/JK4) (FR2 B3/JK4) (FR3 B3/JK4) (FR4 B3/JK4)	DIIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVS NDVAWYQOKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQ DYNSPWTFGGGKVEIKR
67 (6) (7) (8) (9)	VH de 1A6.8 (FR1 VH2-70/JH6) (FR2 VH2-70/JH6) (FR3 VH2-70/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTSTVTVSS
38	VL de 1A6.8	SVVMTQTPKFLLVSAGDRVTTITCKASQSVS NDVAWFQOKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQ DYNSPWTFGGGKLEIKR
65 (6) (7) (8) (9)	VH de 1D4.4 (FR1 VH2-70/JH6) (FR2 VH2-70/JH6) (FR3 VH2-70/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL KSVMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARRGIRSAMDYWGQGTSTVTVSS
36	VL de 1D4.4	SVVMTQTPKFLLVSAGDRVTTITCKASQSVS NDVAWYQOKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFIISTVRAEDLAVYFCQQ DYNSPWTFGGGKLEIKR
35	VH de 1D4.5	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLR KSVMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTA DAATYYCTRRGIRSAMDYWGQGTSTVTVSS

129
189

62	VL de 1D4.5	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKASQSVS
(23)	(FR1 B3/JK4)	NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYTGVPD
(24)	(FR2 B3/JK4)	RFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ
(25)	(FR3 B3/JK4)	DYNSFWTFGGGTKVEIKR
(26)	(FR4 B3/JK4)	

Los anticuerpos híbridos fueron purificados mediante cromatografía de Afinidad de proteína A (Ejemplo 1.2.C) y se evaluó su potencia en el ensayo de blasto de PHA como en los Ejemplos 1.1.C2 y 1.1.C3. Las medidas cinéticas se determinaron usando BIAcore como en el Ejemplo 1.1. B. La Tabla 15 muestra los valores de K_D e IC_{50} de los anticuerpos híbridos. Los datos de potencias y afinidad derivados con los mAbs híbridos se compararon con los datos generados con los MABs con CDR injertada apropiados (Ejemplo 2.3.1) para identificar cambios de potencia y afinidad atribuidos a una cadena VH o VL particular. Se evaluó si una cadena VH o VI humanizada era la cadena óptima o no, usando los métodos descritos en el Ejemplo 2.3.1. En algunso casos, los residuos que no cayeron dentro de los 4.5 Å de cualquier átomo de CDR fueron marcados adicionalmente para retro mutaciones.

Tabla 15: Neutralización de IL-12 mediante anticuerpos anti-IL-12p40 híbridos y afinidad de anticuerpos anti-IL-12p40 híbridos

Anticuerpo	1D4.4	1D4.5	1A6.3	1A6.4	1A6.7	1A6.8
Velocidad on (1/M·s)	2.8x10 ⁵	3x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1.1x10 ⁵	ND	ND
Velocidad off (1/M·s)	2.1x10 ⁻⁵	3.1x10 ⁻⁵	2.6x10 ⁻⁵	1.1x10 ⁻⁴	ND	ND
K_D (nM)	0.074	0.11	0.14	1.0	ND	ND
IC_{50} prom (nM) IL-12 hum	0.64	0.053	0.068	2.1	0.29	0.08
IC_{50} prom (nM) IL-12 cyno	1.1	0.11	0.049	1.2	0.35	0.06

275
188
190

Ejemplo 2.3.3: Construcción de retro mutaciones de marco en anticuerpos con CDR injertada

Para generar anticuerpos humanizados, se introdujeron retro mutaciones de marco en anticuerpos de CDR injertada usando cebadores mutagénicos y el kit de Mutagénesis Dirigido a Sitios Múltiples QuikChange (Stratagene #200513, La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se construyeron diferentes combinaciones de retro mutaciones para cada una de las CDR injertadas para identificar la importancia relativa de cada residuo. Variante 1 VKB3 de cadena ligera de 1A6.1 (L1-D→S, L2-I→V, L36-Y→F, L67-S→Y), variante 2 VKB3 de 1D4.1 (L1-D→S, L36-Y→F, L67-S→Y), variante VKB3 de 1D4.1 (L1-D→S, L67-S→Y), variante 4 VKB3 de 1D4.1 (L2-I→V, L67-S→Y), y variante 5 VKB3 de 1D4.1 (L67-S→Y). variante 1 VH2-70 de cadena pesada de 1D4.1 (H1-E→Q, H93-A→T), y variante 2 VH2-70 de 1D4.1 (H93-A→T). El ADN monocatenario mutado fue entonces transformado en células ultracompetentes XL10-Gold. El secuenciamiento de colonia se realizó en los transformantes para identificar clones que portan las mutaciones deseadas. El ADN plásmido fue aislado de clones positivos usando el Kit Maxiprep Qiagen (Qiagen, Valencia, CA) y las regiones variable y constante fueron secuenciadas en su totalidad. Como se describió anteriormente, se construyeron varias combinaciones adicionales de retro mutaciones para cada uno de los anticuerpos con CDR injertada. La caracterización de los anticuerpos humanizados generados, como se reveló anteriormente, se realizó como se revela en el Ejemplo 2.3.4 siguiente.

100
139
191

Ejemplo 2.3.4: Expresión y caracterización de anticuerpos humanizados

Los vectores de expresión PBOS (ver Ejemplo 2.1 y 2.2.2) que albergan cadenas pesada y ligera que contienen reto mutaciones de marco fueron co-transfectados en células COS para producir temporalmente anticuerpos humanizados de longitud total. Las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se revelan en la Tabla 16.

Tabla 16: Secuencias de Anticuerpos Humanizados

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
67 (6) (7) (8) (9)	VH de 1A6.9 (FR1 VH2-70/JH6) (FR2 VH2-70/JH6) (FR3 VH2-70/JH6) (FR4 VH2-70/JH6)	EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIWWDGDN YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNM DPV DTATYYCARRTRVNY AMDYWGQGT TVTVSS
79	VL de 1A6.9	SVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASQSVS NDVAVFQQKPGQPPKLLIYYASNRYT GVDP RFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQ DYN SPWTFGGGTKVEIKR
80	VH de 1D4.6	EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLS KSMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNM DPV DTATYYCTRRGIR SAMDYWGQGT TVTVSS
81	VL de 1D4.6	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYT GVDP RFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQ DYN SPWTFGGGTKVEIKR
82	VH de 1D4.7	EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLR KSMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNM DPV DTATYYCTRRGIR SAMDYWGQGT TVTVSS
83	VL de 1D4.7	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASQSVS NDVAWYQQKPGQPPKLLIYYASNRYT GVDP RFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQ DYN SPWTFGGGTKVEIKR

102
192

84	VH de 1D4.8	EVTLR ESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR KSV MGVSWIRQPPGKALEWLA HIYW DDDDKY YNPSL KSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCTRRG IRSAMDY WGQGTTVTVSS
85	VL de 1D4.8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKAS QSVS NDVAWY QQKPGQP PKLLIYYAS NRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC QQ DYN SPWTFGGG TKVEIKR
86	VH de 1D4.9	EVTLR ESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR KSV MGVSWIRQPPGKALEWLA HIYW DDDDKY YNPSL KSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCTRRG IRSAMDY WGQGTTVTVSS
87	VL de 1D4.9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKAS QSVS NDVAWY QQKPGQP PKLLIYYAS NRYTGVPD RFSGSGYGT DFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQ DYN SPWTFGGG TKVEIKR
88	VH de 8E1.3	EVKL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGM VWVRQAPGKGLEWVAS ISSGSSNIYY ADTV KGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTED TAVYYCARN PFYWGQ GTTVTVSS
89	VL de 8E1.3	DIVMTQSPSSLSASV GDRV TITCKAS QNVG TNVAWY QQKPEKAPK SLIYSASHRY SGVPS RFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYYC QQ YNSYPL TFGGG TKVEIKR
90	VH de 3G7.3	EVQL VQSGAEVKKPGASVKV SCKATGYTFN DYWIE WVRQAPGQGLEWM GGFSGSGSTNY NEKFK GRVTMTADSS TNTAYMELRSLR SDD TAVYYCARRR FRGMDYWGQ GTTVTVSS
91	VL de 3G7.3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKAS QSVS NDVAWY QQKPGQAPRLL IYYAS NRYTGVPD RFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAV YYC QQ DYSSP WSFGGG TKVEIKR

Las posiciones de amino ácido retro mutadas en las VH y VL de los anticuerpos de CDR injertada se listan en la Tabla 17.

158
193

Tabla 17: Amino ácidos retro mutados presentes en anticuerpos humanizados

Nombre Anticuerpo	Mutaciones en VH	Mutaciones en VK
1A6.9	Ninguna	L1 D →S L2 I →V L36 Y →F L67 S →Y
1D4.6	H93 A →T	L2 I →V L67 S →Y
1D4.7	H30 S →R H93 A →T	L2 I →V L67 S →Y
1D4.8	H30 S →R H93 A →T	Ninguna
1D4.9	H30 S →R H93 A →T	L67 S →Y
8E1.3	H3 Q→ K H49 G→ A H77 S→ T	L3 Q→V
3G7.3	H25 S→ T H30 T→ N H71 T→ A H73 T→ S H76 S→ N	L58 I→ V L60 A→D

Los sobrenadantes de célula que contienen anticuerpos humanizados fueron purificados como se describe en el Ejemplo 1.2.C. Se determinó la habilidad de los anticuerpos humanizados purificados para neutralizar IL-12 *in vitro* usando el ensayo de blasto de PHA como se describe en los Ejemplos 1.1. C2 y 1.1. C3. Las afinidades de enlace de los anticuerpos purificados a IL-12p70 humana purificada recombinante se determinaron usando BIAcore como se describe en el Ejemplo 1.1. B. La Tabla 18 muestra los valores de IC₅₀ del ensayo de blasto de PHA y la K_Ds del BIAcore.

289
192
194

Tabla 18: Neutralización de IL-12 por anticuerpos anti-IL-12p40 humanizados y afinidad de anticuerpos anti-IL-12p40 humanizados

Anticuerpo	1D4.6	1D4.7	1D4.8	1D4.9	1A6.9	SE1.3	3G7.3
Velocidad on (1/M·s)	4.8x10 ⁻⁵	>1x10 ⁻⁵	1.2x10 ⁻⁵	5.3x10 ⁻⁵	3.5x10 ⁻⁵	1.3x10 ⁻⁶	7.8x10 ⁻⁶
Velocidad off (1/M·s)	<1x10 ⁻⁵	<1x10 ⁻⁵	<1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁶	<1x10 ⁻⁵	1.0x10 ⁻³	1.5x10 ⁻⁴
K _D (nM)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.76	0.2
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 hum	0.15	0.014	0.095	0.035	0.15	10	0.45
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 cyno	ND	0.031	ND	ND	ND	ND	ND

Ejemplo 2.4: Generación de anticuerpos anti IL-12 humana humanizados adicionales

La humanización de las regiones variables de los anticuerpops monoclonales murinos 8E1 y 1A6 se realizó esencialmente de acuerdo con el procedimiento de Queen, C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989). Primero se identificaron los segmentos V humanos con alta homología a las secuencias de amino ácido de VH y VL del anticuerpo monoclonal murino. Luego, las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) junto con los amino ácidos de marco importantes para mantener las estructuras de las CDRs fueron enjertadas en las secuencias de marco humanas seleccionadas. Adicionalmente, los amino ácidos de marco humano que se encontró que eran raros en el subgrupo de la región V correspondiente fueron sustituidos con amino ácidos de consenso para reducir la inmunogenicidad potencial. Los anticuerpos monoclonales humanizados resultantes se

100
193
195

expresaron en células, purificaron y caracterizaron como se describe a continuación.

Los anticuerpos 8E1.4, 8E1.5, 8E1.6, 1A6.10, 1A6.11, y 1A6.12 monoclonales humanizados se generaron de la siguiente forma.

Ejemplo 2.4.1: Generación de anticuerpos 8E1.4, 8E1.5, 8E1.6 monoclonales humanizados

Para la humanización de las regiones variables de 8E1, marcos de región V humana usados como aceptores para las CDRs de 8E1 fueron elegidos con base en la homología de secuencia. Primero, se construyó un modelo a molecular de las regiones variables de 8E1 con la ayuda de los programas de computadora ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Luego, con base en una búsqueda de homología contra las secuencias de segmento V y J humana, se seleccionaron el segmento HA3D1 de VH (Olee, T., et al., J. Exp. Med. 175: 831-842 (1992)) y el segmento JH4 de J (Ravetch, J.V., et al., Cell 27: 583-591 (1981)) para proporcionar los marcos para las regiones variables de cadena pesada de 8E1.4, 8E1.5, y 8E1.6. Para las regiones variables de cadena ligera de 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6, se usaron el segmento HK137 de VL (Bentley, D.L., y Rabbitts, T.H., Cell 32: 181-189 (1983)) y el segmento JK2 de J (Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los amino ácidos de marco entre VH de 8E1 y el aceptor HA3D1 humano y los segmentos JH4 fue del 84%, mientras que la identidad entre el VL de 8E1 y el aceptor HK137 humano y los segmentos JK4 fue del 67%. Las secuencias de aceptor de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano usadas para generar anticuerpos anti-IL-12 humana, humanizados adicionales se listan en las Tablas 19 y 20.

207
144
196

Tabla 19: Secuencias de Aceptor de Cadena Pesada usados para Anticuerpos Humanizados Adicionales

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
92	FR1 M60/JH4	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
7	FR2 M60/JH4	WIRQPPGKALEWLA
8	FR3 M60/JH4	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC AR
93	FR4 M60/JH4	WGQGTLVTVSS
94	FR1 HA3D1/JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	FR2 HA3D1/JH4	WVRQAPGKGLEWVS
17	FR3 HA3D1/JH4	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
95	FR4 HA3D1/JH4	WGQGTLVTVSS

Tabla 20: Aceptor de Cadena Ligera usado para Anticuerpos Humanizados Adicionales

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
30	FR1 III-3R/JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
34	FR2 III-3R/JK4	WYQQKPGKAPKLLIY
96	FR3 III-3R/JK4	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YC
26	FR4 III-3R/JK4	FGGGTKVEIKR
30	FR1 HK137/JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
97	FR2 HK137/JK4	WFQQKPGKAPKSLIY
32	FR3 HK137/JK4	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YC
26	FR4 HK137/JK4	FGGGTKVEIKR

182
145
197**Ejemplo 2.4.2: Construcción de anticuerpos 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6**

Los genes de región variable de cadena pesada y ligera se construyeron y amplificaron usando aproximadamente 30 oligonucleótidos sintéticos de superposición que varían de longitud de aproximadamente 20 a 40 bases siguiendo un método publicado (Rouillard, J.-M., et al, Nucleic Acids Res. 32: W176-W180 (2004)). Los oligonucleótidos fueron fijados y ensamblados con el Sistema de PCR De Alta Fidelidad de Expansión (Expand High Fidelity PCR System) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN), produciendo un producto de longitud total. El producto resultante fue amplificado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando el Sistema de PCR De Alta Fidelidad de Expansión (Expand High Fidelity PCR System). Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados por gel, digeridos con MluI and XbaI, purificados con gel, y subclonados, respectivamente, en una forma modificada de pVg1.D.Tt (Cole, M.S., et al., J. Immunol. 159: 3613-3621 (1997); y ver más adelante) y pV κ (Co, M.S., et al., J. Immunol. 148: 1149-1154 (1992)).

En las posiciones de marco en las cuales el modelo de computadora sugirió contacto significativo con las CDRs, se sustituyeron los amino ácidos de las regiones V de ratón por los amino ácidos de marco humano originales. Esto se hizo en el residuo 49 para las cadenas pesadas de 8E1.4 y 8E1.5, y adicionalmente en el residuo 74 para la cadena pesada de 8E1.6. Para las cadenas ligeras de 8E1.5 y 8E1.6, los reemplazos se hicieron en el residuo 46, y adicionalmente en el residuo 60 para 8E1.5. Los residuos de marco que se encontraron solo raramente en sus posiciones respectivas en los subgrupos de región V humana correspondientes fueron reemplazados con amino ácidos de consenso humanos en las posiciones. Esto se hizo en el residuo 78 para ambas cadenas pesadas de 8E1.5 y 8E1.6, y en el residuo 36 para las cadenas ligeras de 8E1.5 y 8E1.6.

La mutagénesis dirigida al sitio de los genes V sintéticos se hizo usando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange II (Stratagene, La Jolla, CA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las mutaciones específicas en el gen VH de 8E1.6 fueron creadas usando oligos de mutagénesis y métodos de PCR bien conocidos en la técnica. La etapa de PCR se hizo usando Polimerasa de ADN PfuUltra HF (Stratagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante, incubando a 95 °C por 30 seg, seguido por 18 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min y 68 °C por 1 min, seguido por incubación a 68 °C por 7 min. Después de la digestión con DpnI, células Químicamente Competentes TOP10 en cepa de *E. coli* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) fueron transformadas con una pequeña porción del producto de PCR. El ADN miniprep verificado de secuencia fue digerido con MluI y XbaI, y el fragmento de restricción resultante que contiene el gen VH 8E1.6 mutado fue subclonado en el vector de expresión pVgl.D.Tt modificado descrito a continuación.

Igualmente, se crearon mutaciones específicas en el gen VL de 8E1.5 VL usando oligos de mutagénesis y métodos de PCR bien conocidos en la técnica. La etapa de PCR se hizo como se describió anteriormente, y después de la digestión con MluI y XbaI, el fragmento de restricción resultante fue subclonado en el vector de expresión pVk. Las mutaciones fueron verificadas mediante secuenciamiento de nucleótido.

Los genes que codifican VH o VL humanizada fueron diseñados como mini-exones que incluyen péptidos de señal, señales de donador de empalme, y sitios de enzima de restricción apropiados para la clonación posterior en un vector de expresión mamífero. Las señales donadoras de empalme en los mini-exones de VH y VL fueron derivados de las secuencias JH y JH de línea germinal humana correspondientes, respectivamente. La secuencia de péptido de señal en el mini exón de VH humanizado fue MEFGLSWLFLV AILKGVQC (SEQ ID NO. 110), y en los mini exones de VL humanizado fue

184
197
199

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRC (SEQ ID NO. 111). Los genes VH y VL de 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 fueron contruidos por ensamble de oligonucleótidos sintéticos de superposición y métodos de PCR bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 2.4.3: Generación de anticuerpos 1A6.10, 1A6.11 y 1A6.12 Monoclonales Humanizados

Para la humanización de las regiones variables de 1A6.10, 1A6.11 y 1A6.12, se siguió el enfoque proporcionado en la presente invención. Primero, se construyó un modelo a molecular de las regiones variables de 1A6 con la ayuda de los programas de computadora ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Luego, con base en una búsqueda de homología contra las secuencias de segmento V y J humana, se seleccionaron, el segmento M60 de VH (Schroeder, Jr., H.W. y Wang, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146-6150 (1990)) y el segmento JH4 de J (Ravetch, J.V., et al., Cell 27: 583-591 (1981)) para proporcionar los marcos para las regiones variables de cadena pesada de 1A6.10 y 1A6.12. Para las regiones variables de cadena ligera de 1A6.10, 1A6.11 y 1A6.12, se usaron el segmento III-3R de VL (Manheimer-Lory, A., et al., J. Exp. Med. 174: 1639-1652 (1991)) y el segmento JK4 de J (Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). La identidad de los amino ácidos de marco entre VH de 1A6 y el aceptor humano M60 y los segmentos JH4 fue del 74%, mientras que la identidad entre VL de 1A6 y el aceptor III-3R humano y los segmentos JK4 fue del 71%. Las secuencias de anticuerpo fueron generadas como se revela en el Ejemplo 2.3.3.

En las posiciones de marco en las cuales el modelo de computadora sugirió contacto significativo con las CDRs, se sustituyeron los amino ácidos de las regiones V de ratón por los amino ácidos de marco humano originales. Esto se hizo en el residuo 68 para las cadenas pesadas de 1A6.10, 1A6.11 y

280
448
200

1A6.12. Para las cadenas ligeras, los reemplazos se hicieron en los residuos 36 y 67 para 1A6.11 y 1A6.12, y adicionalmente en el residuo 60 para 1A6.12. Los residuos de marco que se encontraron solo raramente en sus posiciones respectivas en los subgrupos de región V humana correspondientes fueron reemplazados con amino ácidos de concenso humanos en aquellas posiciones. Esto se hizo en los residuos 10, 46, 83, 84, 86 y 87 de la cadena pesada, y en el residuo 62 de las cadenas ligeras de 1A6.10, 1A6.11 y 1A6.12. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó usando ooligos mutagénicos y método de PCR como se describió anteriormente.

Las secuencias de amino ácido de las regiones VH y VL resultantes de los anticuerpos anti-IL-12 humanizados adiconales generados se listan en la Tabla 21.

Tabla 21: Secuencias de Anticuerpos Humanizados Adicionales

SEQ ID No.	Región de Proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
98	VH de 1A6.10	EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQLTISKDTSKNQVVLKLTSVDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTLLVTVSS
99	VL de 1A6.10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVS NDVAWYQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPD RFGSGGYGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR
100	VH de 1A6.11	EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQLTISKDTSKNQVVLKLTSVDPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTLLVTVSS
101	VL de 1A6.11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVS NDVAWYQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPD RFGSGGYGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQ DYNSPWTFGGGTKVEIKR

786
201

102	VH de 1A6.12	EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIWWDGDNY YNPSLKSQTLISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARRTRVNYAMDYWGQGTlVTVSS
103	VL de 1A6.12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVS NDVAWFQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVDP RFSGSGYGTDFTFITISSLQPEDATYYCQQ DYNSPWTfGGGgTKVEIKR
104	VH de 8E1.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGmVWVRQAPGKGLEWVASISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDNakNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARnPYWGQGTlVTVSS
105	VL de 8E1.4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG TNVAWYQQKPGKAPKGLIYSASHRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITISSLQPEDFATYYCQQ YNSYPLTFGGGgTKVEIKR
106	VH de 8E1.5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGmVWVRQAPGKGLEWVASISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDNakNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARnPYWGQGTlVTVSS
107	VL de 8E1.5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG TNVAWYQQKPGKAPKGLIYSASHRYSGVDP RFSGSGSGTDFTLTITISSLQPEDFATYYCQQ YNSYPLTFGGGgTKVEIKR
108	VH de 8E1.6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGmVWVRQAPGKGLEWVASISSGSSNIYY ADTVKGRFTISRDDakNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARnPYWGQGTlVTVSS
109	VL de 8E1.6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG TNVAWYQQKPGKAPKGLIYSASHRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITISSLQPEDFATYYCQQ YNSYPLTFGGGgTKVEIKR

Las posiciones de amino ácido en el marco que fueron mutadas se listan en la Tabla 22.

787
200
202

Tabla 22: Posiciones de Mutaciones de Marco en Anticuerpos Humanizados Adicionales

Nombre Anticuerpo	Mutaciones en VH	Mutaciones en VK
1 A6.10	H10 A→ G H46 A→ G H68 R→ Q H83 T→ K H84 M→ L H86 N→ S H87 M→ V	L62 I→ F L67 S→ Y
1A6.11	H10 A→ G H46 A→ G H68 R→ Q H83 T→ K H84 M→ L H86 N→ S H87 M→ V	L36 Y→ F L62 I→ F L67 S→ Y
1A6.12	H10 A→ G H46 A→ G H68 R→ Q H83 T→ K H84 M→ L H86 N→ S H87 M→ V	L36 Y→ F L60 S→ D L62 I→ F L67 S→ Y
8E1.4	H49 S→ A H78 S→ T	L36 F→ Y L46 S→ G
8E1.5	H49 S→ A H78 S→ T	L36 F→ Y L46 S→ G L60 S→ D
8E1.6	H49 S→ A H74 N→ D H78 S→ T	L36 F→ Y L46 S→ G

188
201
203**Ejemplo 2.4.4: Expresión de anticuerpos humaizados adicionales**

El alotipo del gen de región constante gamma-1 humana en el plásmido de expresión pVgl.D.Tt fue modificado del alotipo G1m (z,a) al z, no a. Se usó el método de PCR de superposición-extensión (Higuchi, R., in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York (1989), pp. 61-70) para generar las sustituciones de amino ácido D356E y L358M (numeradas de acuerdo con el índice EU de Kabat, E.A., et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5a ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), usando cebadores de mutagénesis. La etapa de PCR se hizo usando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange II (Stratagene). Después de la digestión o producto generado por PCR con SfiI y EagI, El fragmento de restricción resultante fue subclonado en una forma modificada del vector de expresión pVgl.D.Tt que contiene un sitio de restricción NheI en el intrón entre los exones bisagra y CH2.

Las mutaciones a la región bisagra inferior del gen de región constante gamma-1 también se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio. Específicamente se generaron las sustituciones de amino ácido L234A y L235A (numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, E.A., et al.) usando oligos de mutagénesis. La etapa de PCR se hizo usando el Kit DE Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange II (Stratagene) como se describió anteriormente. Después de la digestión del producto generado por PCR con NheI y EagI, el fragmento de restricción resultante fue subclonado en el vector de expresión pVgl.D.Tt modificado descrito anteriormente, que contiene las mutaciones D356E y L358M y un sitio NheI en el intrón entre los exones bisagra y CH2. Las mutaciones fueron verificadas mediante secuenciamiento de nucleótido.

Las secuencias de amino ácido de los mini-exones de VH y VL humanizados se muestran en la Tabla 21. Los fragmentos de gen V resultantes

189
202
204

fueron clonados, respectivamente, en una forma modificada de pVgLD.Tt y pVk.

La línea celular de riñón humana 293T/17 (Colección Americana De tipos de Cultivo - American Type Culture Collection, Manassus, VA) se mantuvo en DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contiene 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (HyClone, Logan, UT), amino ácidos no esenciales MEM 0.1 mM (Invitrogen Corporation) y L-glutamina 2 mM (Invitrogen Corporation), de aquí en adelante referido como medio 293, a 37 °C en un incubador al 7.5% de CO₂. Para la expresión y purificación de anticuerpos monoclonales después de la transfección temporal, las células 293T/17 fueron incubadas en DMEM que contiene 10% de FBS de IgG bajo (HyClone), amino ácidos no esenciales MEM 0.1 mM y L-glutamina 2 mM, de aquí en adelante referido como medio 293 de IgG bajo.

La transfección temporal de las células 293T/17 se realizó usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Aproximadamente 2×10^7 células por transfección fueron colocadas en placa en un frasco T-175 en 50 ml de medio 293 y crecieron durante la noche hasta confluencia. El siguiente día, 35 µg de plásmido de cadena ligera y 35 µg de plásmido de cadena pesada fueron combinados con 3.75 ml de Hibridoma-SFM (HSFM) (Life Technologies, Rockville, MD). En un tubo separado se combinaron 175 µl de reactivo de Lipofectamina 2000 y 3.75 ml de HSFM e incubaron por 5 min a temperatura ambiente. La mezcla de 3.75 ml de Lipofectamina 2000-HSFM fue mezclada cuidadosamente con la mezcla de 3.75ml de DNA-HSFM y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. El medio que cubre las células 293T/17 fue aspirado y reemplazado con medio 293 de IgG bajo, luego se agregaron los complejos lipofectamina-ADN por gotas a las células, se mezclaron cuidadosamente mediante remolinos, y las

290
203
205

células fueron incubadas por 7 días a 37 °C en un incubador con 7.5% de CO₂ antes de cosechas los sobrenadantes.

Los transfectantes temporales que producen 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 fueron generados como se describió anteriormente.

La expresión de anticuerpos 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 humanizados se midió por ELISA emparejado. Las placas de ELISA MaxiSorp (Nunc Nalge International, Rochester, NY) fueron recubiertas durante la noche a 4 °C con 100 µl/pozo de una dilución 1:1000 de anticuerpos policlonales específicos de cadena Fcγ anti-IgG humana de cabra AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) en amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.2 M, pH 9.4, lavados con Amortiguador de Lavado (PBS que contiene 0.1% de Tween 20), y bloqueados por 1 hr a temperatura ambiente con 300 µl/pozo de Amortiguador de Bloqueo SuperBlock en TBS (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Después de lavado con Amortiguador de Lavado, las muestras que contienen 8E1.4, 8E1.5 o 8E1.6 fueron apropiadamente diluidas en Amortiguador de ELISA (PBS que contiene 1% de BSA y 0.1% de Tween 20) y 100 µl/pozo como se aplicaron a las placas de ELISA. Como estándar se usó el anticuerpo IgG1/κ humanizado daclizumab (PDL BioPharma, Inc.). Después de incubación de las placas por 1 hr a temperatura ambiente, y lavado con Amortiguador de Lavado, se detectaron los anticuerpos enlazados usando 100 µl/pozo de una dilución 1:1000 de anticuerpos policlonales específicos de cadena ligera kappa anti-humanos conjugados a HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). Después de incubación por 1 hr a temperatura ambiente, y lavado con Amortiguador de Lavado, se llevó a cabo desarrollo de color agregando 100 µl/pozo de Sustrato ABTS Peroxidasa/Solución de Peroxidasa B (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). Después de incubación por 7 min a temperatura ambiente,

189
294
206

el desarrollo de color se detuvo agregando 50 μ l/pozo de 2% de ácido oxálico. Se leyó la absorbancia a 415 nm usando un lector de microplaca VersaMax (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Los sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de células 293T/17 transfectadas temporalmente fueron analizados por ELISA para la producción de 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6. Típicamente se observaron niveles de expresión de aproximadamente 30-50 μ g/ml. Las muestras que eran positivas fueron sometidas a purificación como se describe a continuación.

Ejemplo 2.4.5: Purificación de anticuerpos humanizados adicionales

Los anticuerpos monoclonales 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 IgG1/ κ fueron purificados del cultivo agotado con una columna de Proteína A Sefarosa de la siguiente forma. Los sobrenadantes del cultivo de las transfecciones temporales fueron recolectados mediante centrifugación, y se filtraron estériles. El pH de los sobrenadantes filtrados fue ajustado mediante la adición de 1/50 de volumen de citrato de sodio 1 M, pH 7.0. Los sobrenadantes fueron corridos en una columna HP de Proteína A HiTrap de 1 ml (GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, Piscataway, NJ) que fue pre-equilibrada con citrato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0. La columna fue lavada con el mismo amortiguador, y el anticuerpo enlazado fue eluído con citrato de sodio 20 mM, pH 3.5. Después de neutralización por la adición de 1/50 de volumen de citrato de sodio 1.5 M, pH 6.5, las fracciones de anticuerpo recolectadas fueron concentradas hasta ~0.5-1.0 mg/ml usando un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 de 15 ml (30,000 dalton MWCO) (Millipore Corporation, Bedford, MA). Las muestras fueron entonces filtradas esterilizadas usando un filtro jeringa Acrodisc de 0.2 μ m con membrana HT Tuffryn (Pall Corporation, East Hills, NY). Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron mediante espectroscopía UV midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1.4 A_{280}).

181
205
207

El análisis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras indicó que los anticuerpos tenían un peso molecular de aproximadamente 150-160 kD. El análisis bajo condiciones reductoras indicó que los anticuerpos comprendían una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kD. La pureza de los anticuerpos parece ser de más del 95%.

Ejemplo 2.4.6: Caracterización de anticuerpos humanizados adicionales usando ELISA de Competición

Placas de ELISA MaxiSorp (Nalge Nunc International) fueron recubiertas durante la noche a 4 °C con 100 µl/pozo de 1.0 µg/ml de IL-12 humana en amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.2 M, pH 9.4, lavadas con Amortiguador de Lavado (PBS que contiene 0.1% de Tween 20), y bloqueadas por 1 hr a temperatura ambiente con 300 µl/pozo de Amortiguador de Bloqueo SuperBlock en TBS (Pierce Chemical Company). Después de lavado con Amortiguador de Lavado, una mezcla de 8E1 biotinilado (0.8 µg/ml de concentración final) y anticuerpo competidor (8E1 o 8E1.4 o 8E1.5 o 8E1.6) partiendo a 100 µg/ml de concentración final y serialmente diluidos 3 veces) en 100 µl/pozo de amortiguador de ELISA, se agregó en duplicado. Como controles de isotipo, se usaron 100 µl/pozo de 100 µg/ml de anticuerpos monoclonales IgG1/κ de ratón (MuFd79) o IgG1/κ (HuFd79) en amortiguador de ELISA. Como un control no competidor, se usaron 100 µl/pozo de Amortiguador de ELISA. Después de incubar las placas por 1 hr a temperatura ambiente, y lavado con Amortiguador de Lavado, los anticuerpos enlazados fueron detectados usando 100 µl/pozo de 1 µg/ml de estreptavidina conjugada a HRP (Pierce Chemical Company) en amortiguador de ELISA. Después de incubación por 1 hr a temperatura ambiente, y lavado con Amortiguador de

193
226
203

Lavado, se llevó a cabo el desarrollo de color agregando 100 µl/pozo de Sustrato ABTS Peroxidasa/Solución de Peroxidasa B (KPL, Inc.). Después de incubación por 5 min a temperatura ambiente, el desarrollo de color se detuvo agregando 50 µl/pozo de 2% de ácido oxálico. Se leyó la abosorbancia a 415 nm.

La afinidad de 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 a la IL-12 humana se analizó mediante ELISA de competición como se describió anteriormente. Tanto 8E1 como las tres versiones humanizadas compitieron con E81 biotinilado en una manera dependiente de la concentración. La Tabla 23 muestra los valores de IC₅₀ de 8E1, 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6 obtenidos usando el software de computadora GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Tabla 23: Propiedades de enlace de los anticuerpos 8E1.4, 8E1.5 y 8E1.6

Anticuerpo	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio	D.E.
8E1	2.63	2.78	2.28	2.56	0.26
8E1.4	N.D.	N.D.	8.33	N/A	N/A
8E1.5	N.D.	N.D.	13.4	N/A	N/A
8E1.6	2.25	2.43	1.61	2.10	0.43

Los valores representan la IC₅₀ (µg/ml) requerida para competir con 0.8 (µg/ml) de anticuerpo 8E1 biotinilado.

Los anticuerpos 1A6.10, 1A6.11, 1A6.12, 8E1.4 y 8E1.5 también fueron generados usando los métodos descritos en el Ejemplo 2.3. Los anticuerpos se expresaron en células COS y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Proteína A como se describe en los ejemplos 2.2.2 y 1.2.C, respectivamente. Estos mAbs purificados fueron caracterizados por IC₅₀ y K_D de acuerdo con el 1.1.B y 1.1.C 2. La Tabla 24 muestra las propiedades de enlace de 1A6.10, 1A6.11, 1A6.12, 8E1.4 y 8E1.5.

794
287
209

Tabla 24: Parámetros cinéticos y de potencia de anticuerpos humanizados adicionales

Anticuerpo	1A6.10	1A6.11	1A6.12	8E1.4	8E1.5	8E1.6
Velocidad on (1/M·s)	3.2x10 ⁵	ND	7.4x10 ⁵	8x10 ⁵	1.6x10 ⁵	1.7x10 ⁶
Velocidad off (1/M·s)	7.6x10 ⁻⁶	ND	3x10 ⁻⁴	1x10 ⁻³	1.24x10 ⁻³	8x10 ⁻⁵
K _D (nM)	0.024	ND	0.4	1.3	0.75	0.046
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 hum	0.15	ND	0.088	12	8	ND
IC ₅₀ prom (nM) IL-12 cyno	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La presente invención incorpora por referencia en su totalidad, técnicas bienconocidas en el campo de la biología molecular. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, técnicas descritas en las siguientes publicaciones:

Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

295
202
210

Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 p. (ISBN 0-89573-614-4).

Referencias:

Patentes U.S.

4,816,397,

4,816,567,

4,880,078;

5,985,309,

5,223,409;

5,225,539;

5,258,498;

5,290,540,

5,290,540,

5,403,484;

5,427,908;

5,516,637;

5,530,101;

5,571,698;

5,580,717;

5,585,089,

198
209
211

5,658,727;
5,693,762,
5,714,352,
5,723,323,
5,733,743
5,750,753;
5,766886,
5,780,225;
5,817,483,
5,821,047;
5,824,514,
5,855,913,
5,874,064,
5,934,272,
5,939,598,
5,969,108;
5,976,862,
5,985,320,
5,985,309,
5,985,615,
5,998,209,
5,624,821
5,723,323,
5,763,192,
5,814,476,
6,075,181,
6,091,001,
6,114,598
6,130,364
6,180,370,

197
210
212

6,204,023,

6,350,861,

5,585,089,

6,914,128

4,526,938,

4,980,286,

5,912,015;

4,946,778,

5,916,597;

5,128,326;

5,565,352).

5,679,377;

5,989,463;

5,225,539;

5,565,332,

5,698,426;

5,714,350,

5,807,715,

6,019,968,

6,019,968,

5,627,052,

5,916,771,

5,648,260,

6,699,658,

Solicitud U.S.

09/428,082

Publicación de Patente U. S

20020137134,

20040018590,

20030186374,

1878
211
213

20050042664 A1

US2006104968

Patentes Extranjeras

WO 97/15327,

WO 00/56772 A1

WO 91/17271,

WO 92/09690,

WO9937682 A2,

WO 92/15679,

WO 92/01047,

WO2002097048A2,

WO9524918 A1,

PCT/GB91/01134,

WO 99/25044,

WO 97/29131,

WO 98/31700

WO 99/15154;

WO 92/19244,

WO 92/19244,

WO 00/37504,

WO 00/56772,

WO 91/05548,

WO 91/09967,

WO 91/09967;

WO 92/02551

WO92/22324

WO96/20698,

WO 97/29131

WO01/83525.

199
211
264

WO2003016466A2,
WO2005100584 A2).
WO 03/035835;
WO 90/02809,
PCT/US91/05939,
PCT7US91/09630,
PCT/US94/01234,
PCT/US96/18978,
PCT/US98/16280,
WO 92/20791,
WO 90/05144 A1
WO 00 09560,
WO 00/037504,
WO 02072636,
WO 91/10737,
WO 91/10741
WO 92/01047,
WO 92/18619,
WO 93/11236,
WO 94/02602,
WO 95/15982,
WO 95/20401,
WO 96/33735
WO 97/32572,
WO 97/32572,
WO 97/44013,
WO 97/44013,
WO 98/16654
WO 98/24893,
WO 98/31346,

200
215

WO 98/31346,
WO 98/50433,
WO 99/45031,
WO 99/53049,
WO 99/543428,
WO 99/66903
WO 99/66903,
WO90/14424,
WO90/14430,
WO90/14443
WO2004078140,

Patente Europea No:

EP 229246,
EP 239,400,
EP 239,400;
EP 519,596,
EP 519,596;
EP 592,106;
EP 592,106;
EP 1,176,195;
GB89/01334,
GB91/01134,
GB92/01755;

Otras Referencias:

Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995),
Babcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848,
Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982,

201
214
216

- Bentley, D.L., and Rabbitts, T.H., Cell 32: 181-189 (1983),
Berrebi et al. (1998) Am. J Path 152:667-672,
Better et al., Science 240:1041-1043 (1988),
Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426,
Breitling *et al.* Publicación PCT No. WO 93/01288,
Brinkman et al., J. Immunol. Métodos 182:41-50 (1995),
Broberg, et al. (2002) J. Interferon Cytokine Res. 22:641-651,
Brown et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2663-2667,
Bucht et al., (1996) Clin. Exp. Immunol. 103:347-367,
Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507;
Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994),
Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992);
Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987),
Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992),
Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989),
Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628,
Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854,
Co, M.S., et al., J. Immunol. 148: 1149-1154 (1992)
Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361- 1367,
Cole, M.S., et al., J. Immunol. 159: 3613-3621 (1997),
Cooper, et al. (2002) J. Immunol. 168:1322-1327,
Cua et al. (2003) Nature 421:744-748,
Duchmarm et al., J Immunol. 26:934- 938(1996),
During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351;
Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2,
Elkins, et al. (2002) Infection Immunity 70:1936-1948,
Fais et al. (1994) J Interferon Res. 14:235-238;
Foote and Winter (1992), J. Mol. Biol. 224:487-499,

- Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372,
- Fuss, et al., (1996) *J Immunol.* 157:1261-1270,
- Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377,
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999),
- Gillies et al., (1989) *J. Immunol. Métodos* 125:191-202,
- Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505;
- Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984),
- Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580,
- Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998),
- Green *et al. Nature Genetics* 7:13-21 (1994)
- Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734,
- Hammerling, et al.: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981),
- Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988),
- Hawkins et al. (1992) *JMol Biol* 226:889-896
- Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85,
- Hieter, P.A., et al., *J. Biol. Chem.* 257: 1516-1522 (1982),
- Higuchi, R., in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York (1989), pp. 61-70),
- Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448,
- Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137,
- HoogenboomHR., (1997) *775 Tech.* 15:62-70;
- Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445;
- Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145;
- Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378,
- Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105);

203
216
218

- Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281,
Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883,
Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991);
Johnnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.
Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131,
Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868,
Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986);
Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson,
Junghans, *et al.* (1990) *Cancer Res.* 50:1495-1502,
Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391.
Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242,
Kang *et al.* *Publicación PCT No.* WO 92/18619,
Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597,
Kettleborough *et al.* (1991) *Prot. Engineer.* 4:773-783,
Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994),
Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058,
Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101,
Kobayashi, *et al.* (1989) *J Exp Med* 170:827-845;
Kohler, G. and Milstein 1975, *Nature*, 256:495,
Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5),
Ladner *et al.* *Patente U.S. No.* 5,223,409,
Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760,
Langer (1990), *Science* 249:1527-1533,
Langrish *et.al.* (2004) *Immunological Reviews*202: 96-105,

204
219
219

Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983),
Levy et al., 1985, Science 228:190;
Ling, et al. (1995) J Exp Med 154:116-127;
Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370,
Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657,
MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996),
Manheimer-Lory, A., et al., J. Exp. Med. 174: 1639-1652 (1991),
Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001),
McCafferty *et al*, *Nature* (1990) 348:552-554,
Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC
Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product
Design and Performance,
Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997),
Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322,
Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17,
Monteleone et al., (1997) Gastroent. 112:1169-1178,
Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993,
TIBTECH 11(5): 155-215,
Morita et al., (1998) Arth. and Rheumat. 41:306-314,
Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855,
Morrison, Science 229:1202 (1985),
Mulligan, Science 260:926- 932 (1993);
Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992), Murphy et al. J Exp Med
198:1951-1957;
Murphy et al. J Exp Med 198:1951-1957;
Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608,
Neurath et al., J Exp. Med 182:1281-1290 (1995),
Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon
Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology
39:179-189,

205
218
220

- Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986);
- Olee, T., et al., *J. Exp. Med.* 175: 831-842 (1992),
- Oppmann et al. (2000) *Immunity* 13:715-725,
- Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995),
- Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991),
- Parham, et al. (2002) *J. Immunol.* 168:5699-5708,
- Parronchi et al (1997) *Am. J. Path.* 150:823-832,
- Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997),
- Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernytsky, A., Schlessinger, A., et al. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* 53 (Suppl. 6): 430-435),
- Pirhonen, et al. (2002) *J. Immunol.* 169:5673-5678,
- Podlaski, et al. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294:230-237,
- Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123,
- Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993),
- Queen, C, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989),
- R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11-16,
- R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621)
- Ranger y Peppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61;
- Ravetch, J. V., et al., *Cell* 27: 583-591 (1981),
- Remington's *Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995),
- Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988),
- Roberts, R.W. and Szostak, J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302,
- Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994);
- Rouillard, J.-M., et al., *Nucleic Acids Res.* 32: W176-W180 (2004),
- Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574),
- Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995),

296
219
221

- Schroeder, Jr., H.W. and Wang, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146-6150 (1990),
- Seder, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-10192,
- Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20;
- Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002),
- Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740,
- Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993);
- Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993);
- Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).
- Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
- Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397,
- Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994);
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
- Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454
- Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295,
- Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596;
- Trinchieri et al., (2003) Immunity 19:641-644,
- Trinchieri, G. (2003) Nat. Rev. Immun. 3:133-146,
- U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627,
- Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1,
- Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220,
- Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)),
- Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109,
- Ward et al, (1989) Nature 341:544-546,
- Welschof, M. and Krauss, J. Methods In Molecular Biology, Vol 207,
- Windhagen et al., (1995) J Exp. Med. 182:1985-1996,
- Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987),

207
220
222

Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717-2723),
Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95;
Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987),

Aunque un número de realizaciones y características han sido descritas anteriormente, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer modificaciones y variaciones de las realizaciones y características descritas sin apartarse de la presente revelación o la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Cada una de las publicaciones mencionadas aquí está incorporada por referencia.

223

Reivindicaciones

Reivindicamos:

1. Una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, dicha proteína de unión es capaz de unirse a una subunidad p40 de IL-12, dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

CDR-H1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 55), en donde;

X_1 es D, K, T, o S;

X_2 es Y, S, o T;

X_3 es Y, V, G, W, S, o F;

X_4 es I, o M;

X_5 es H, G, E, o V;

X_6 es V, o no está presente; y

X_7 es S, o no está presente;

CDR-H2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} - X_{18} - X_{19} - X_{20} (SEQ ID NO: 56), en donde;

X_1 es H, D, G, W, S, Y o R;

X_2 es I, o F;

X_3 es Y, W, L, S, N, D o G;

X_4 es W, P, H, T, o S;

X_5 es D, G, E, A, o I;

X_6 es D, G, S, T, o N;

X_7 es D, G, S, o P;

X_8 es K, N, S, E, T, o H;

209
222
224

- X₉ es Y, T, P, I, o N;
- X₁₀ es Y, N, T, H, K, S, or G;
- X₁₁ is N, o Y;
- X₁₂ es P, N, A, D, o S;
- X₁₃ es S, E, D, o P;
- X₁₄ es L, K, D, T o Y;
- X₁₅ es K, F, V, M, R, o A;
- X₁₆ es S, K, Q, P, o no está presente;
- X₁₇ es D, G, R, o no está presente;
- X₁₈ es F, o no está presente;
- X₁₉ es Q, o no está presente; y
- X₂₀ es D, o no está presente;

CDR-H3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO: 57), en donde;

- X₁ es R, N o W;
- X₂ es G, T, R, P, o H;
- X₃ es I, R, F, Y, o Q;
- X₄ es R, V, Y, F, o A;
- X₅ es S, N, G, A, o R;
- X₆ es A, Y, L, F, o M;
- X₇ es M, A, D, L, o F;
- X₈ es D, M, Y, o W;
- X₉ es Y, D, o N;
- X₁₀ es Y, A, o no está presente;
- X₁₁ es M, o no está presente;
- X₁₂ es D, o no está presente; y
- X₁₃ es Y, o no está presente;

2/23/2025

CDR-L1. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} (SEQ ID NO: 58), en donde;

- X_1 es K, o R;
- X_2 es A;
- X_3 es S;
- X_4 es Q, o E;
- X_5 es S, o N;
- X_6 es V, o I;
- X_7 es S, G, o D;
- X_8 es N, T, o K;
- X_9 es D, N, o Y;
- X_{10} es V, G, o L;
- X_{11} es A, I, o H;
- X_{12} es S, o no está presente;
- X_{13} es F, o no está presente;
- X_{14} es M, o no está presente; y
- X_{15} es N, o no está presente;

CDR-L2. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 (SEQ ID NO: 59), en donde;

- X_1 es Y, o S;
- X_2 es A, o T;
- X_3 es S, o A;
- X_4 es N, H, S, o Q;
- X_5 es R, N, o S;
- X_6 es Y, Q, o I;
- X_7 es T, S, o G; y
- X_8 es S, o no está presente;

y

CDR-L3. X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 60), en donde;

226 241
224

- X₁ es Q;
- X₂ es Q;
- X₃ es D, Y, o S;
- X₄ es Y, N, K, o I;
- X₅ es N, T, S, o E;
- X₆ es S, Y, V, o W;
- X₇ es P;
- X₈ es W, F, Y, L, o P; y
- X₉ es T, o S.

2. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 35; | residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 45; |
| residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 35; | residuos 99-101 de SEQ ID NO.: 45; |
| residuos 100-108 de SEQ ID NO.: 35; | residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 46; |
| residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 36; | residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 46; |
| residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 36; | residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 46; |
| residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 36; | residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 47; |
| residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 37; | residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 47; |
| residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 37; | residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 47; |
| residuos.100-109 de SEQ ID NO.: 37; | residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 48; |
| residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 38; | residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 48; |
| residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 38; | residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 48; |
| residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 38; | residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 49; |
| residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 39; | residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 49; |
| residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 39; | residuos 99-111 de SEQ ID NO.: 49; |
| residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 39; | residuos 24-38 de SEQ ID NO.: 50; |
| residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 40; | residuos 5.3-60 de SEQ ID NO.: 50; |

227312
228

residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 40; residuos 93-101 de SEQ ID NO.: 50;
residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 40; residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 51;
residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 41; residuos 52-67 De SEQ ID NO.: 51;
residuos 50-66 de SEQ ID NO. : 41 residuos 100-109 de SEQ ID NO.: 51;
residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 41; residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 52;
residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 42; residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 52;
residuos 50-56 de SEQ ID NO.:42; residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 52;
residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 42; residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 53;
residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 43; residuos 47-66 de SEQ ID NO.: 53;
residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 43; residuos 99-107 de SEQ ID NO.: 53;
residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 43; residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 54;
residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 44; residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 54;
residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 44; y
residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 44; residuos 89-97 de SEQ ID NO. :54.
residuos 31-35 de SEQ ID NO.:45;

3. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDRs.

4. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dichas al menos 3 CDRs son seleccionados de un conjunto de CDR de dominio variable que consiste de:

Conjunto de CDR 1D4 VH	
CDR-H1 1D4 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 35
CDR-H2 1D4 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 35
CDR-H3 1D4 VH	Residuos 100-108 de SEQ ID NO.: 35
Conjunto de CDR 1D4 VL	
CDR-L1 1D4 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 36

CDR-L2 1D4 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 36
CDR-L3 1D4 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 36
Conjunto de CDR 1A6 VH	
CDR-H1 1A6 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 37
CDR-H2 1A6 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 37
CDR-H3 1A6 VH	Residuos 100-109 de SEQ ID NO.: 37
Conjunto de CDR 1A6 VL	
CDR-L1 1A6 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 38
CDR-L2 1A6 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 38
CDR-L3 1A6 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 38
Conjunto de CDR 1D8 VH	
CDR-H1 1D8 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 39
CDR-H2 1D8 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 39
CDR-H3 1D8 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 39
Conjunto de CDR 1D8 VL	
CDR-L1 1D8 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 40
CDR-L2 1D8 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 40
CDR-L3 1D8 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 40
Conjunto de CDR 3G7 VH	
CDR-H1 3G7 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 41
CDR-H2 3G7 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 41
CDR-H3 3G7 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 41
Conjunto de CDR 3G7 VL	
CDR-L1 3GT VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 42
CDR-L2 3GT VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 42
CDR-L3 3GT VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 42
Conjunto de CDR 5E8 VH	
CDR-H1 5E8 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 43
CDR-H2 5E8 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 43

229 222 214

CDR-H3 5E8 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 43
Conjunto de CDR 5E8 VL	
CDR-L1 5E8 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 44
CDR-L2 5E8 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 44
CDR-L3 5E8 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 44
Conjunto de CDR 8E1 VH	
CDR-H1 8E1 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 45
CDR-H2 8E1 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 45
CDR-H3 8E1 VH	Residuos 99-101 de SEQ ID NO.: 45
Conjunto de CDR 8E1 VL	
CDR-L1 8E1 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 46
CDR-L2 8E1 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 46
CDR-L3 8E1 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 46
Conjunto de CDR 1H6 VH	
CDR-H1 1H6 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 47
CDR-H2 1H6 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 47
CDR-H3 1H6 VH	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.: 47
Conjunto de CDR 1H6 VL	
CDR-L1 1H6 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 48
CDR-L2 1H6 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 48
CDR-L3 1H6 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 48
Conjunto de CDR 3A11 VH	
CDR-H1 3A11 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 49
CDR-H2 3A11 VH	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 49
CDR-H3 3A11 VH	Residuos 99-111 de SEQ ID NO.: 49
Conjunto de CDR 3A11 VL	
CDR-L1 3A11 VL	Residuos 24-38 de SEQ ID NO.: 50
CDR-L2 3A11 VL	Residuos 53-60 de SEQ ID NO.: 50
CDR-L3 3A11 VL	Residuos 93-101 de SEQ ID NO.: 50

Conjunto de CDR 4B4 VH	
CDR-H1 4B4 VH	Residuos 31-37 de SEQ ID NO.: 51
CDR-H2 4B4 VH	Residuos 52-67 de SEQ ID NO.: 51
CDR-H3 4B4 VH	Residuos 100-109 de SEQ ID NO.: 51
Conjunto de CDR 4B4 VL	
CDR-L1 4B4 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 52
CDR-L2 4B4 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 52
CDR-L3 4B4 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 52
Conjunto de CDR 7G3 VH	
CDR-H1 7G3 VH	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.: 53
CDR-H2 7G3 VH	Residuos 47-66 de SEQ ID NO.: 53
CDR-H3 7G3 VH	Residuos 99-107 de SEQ ID NO.: 53
Conjunto de CDR 7G3 VL	
CDR-L1 7G3 VL	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.: 54
CDR-L2 7G3 VL	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.: 54
CDR-L3 7G3 VL	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.: 54

5. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.

6. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionada de un grupo que consiste de:

- Conjunto de CDR 1D4 VH & Conjunto de CDR 1D4 VL;
- Conjunto de 1A6 VH & Conjunto de 1A6 VL;
- Conjunto de CDR 1D8 VH & Conjunto de CDR 1D8 VL;
- Conjunto de CDR 3G7 VH & Conjunto de CDR 3G7 VL;
- Conjunto de 5E8 VH & Conjunto de CDR 5E8 VL;
- Conjunto de CDR 8E1 VL & Conjunto de CDR 8E1 VL;

231 226
224

Conjunto de CDR 1H6 VH & Conjunto de CDR 1H6 VL;
Conjunto de CDR 3A11 VH & Conjunto de CDR 3A11 VL;
Conjunto de CDR 4B4 VH & Conjunto de CDR 4B4 VL; y
Conjunto de CDR 7G3 VH & Conjunto de CDR 7G3 VL.

7. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende un marco aceptor humano.
8. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además un marco aceptor humano.
9. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un marco aceptor humano.
10. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un marco aceptor humano.
11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 32
SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 33
SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 21	SEQ ID NO.: 34
SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 22	SEQ ID NO.: 92
SEQ ID NO.: 10	SEQ ID NO.: 23	SEQ ID NO.: 93
SEQ ID NO.: 11	SEQ ID NO.: 24	SEQ ID NO.: 94
SEQ ID NO.: 12	SEQ ID NO.: 25	SEQ ID NO.: 95
SEQ ID NO.: 13	SEQ ID NO.: 26	SEQ ID NO.: 96
SEQ ID NO.: 14	SEQ ID NO.: 27	Y

232 277
230

SEQ ID NO.: 15	SEQ ID NO.: 28	SEQ ID NO.: 97.
SEQ ID NO.: 16	SEQ ID NO.: 29	
SEQ ID NO.: 17	SEQ ID NO.: 30	
SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 31	

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 32
SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 33
SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 21	SEQ ID NO.: 34
SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 22	SEQ ID NO.: 92
SEQ ID NO.: 10	SEQ ID NO.: 23	SEQ ID NO.: 93
SEQ ID NO.: 11	SEQ ID NO.: 24	SEQ ID NO.: 94
SEQ ID NO.: 12	SEQ ID NO.: 25	SEQ ID NO.: 95
SEQ ID NO.: 13	SEQ ID NO.: 26	SEQ ID NO.: 96
SEQ ID NO.: 14	SEQ ID NO.: 27	Y
SEQ ID NO.: 15	SEQ ID NO.: 28	SEQ ID NO.: 97.
SEQ ID NO.: 16	SEQ ID NO.: 29	
SEQ ID NO.: 17	SEQ ID NO.: 30	
SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 31	

13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 32
SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 33
SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 21	SEQ ID NO.: 34

233 218
231

SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 22	SEQ ID NO.: 92
SEQ ID NO.: 10	SEQ ID NO.: 23	SEQ ID NO.: 93
SEQ ID NO.: 11	SEQ ID NO.: 24	SEQ ID NO.: 94
SEQ ID NO.: 12	SEQ ID NO.: 25	SEQ ID NO.: 95
SEQ ID NO.: 13	SEQ ID NO.: 26	SEQ ID NO.: 96
SEQ ID NO.: 14	SEQ ID NO.: 27	Y
SEQ ID NO.: 15	SEQ ID NO.: 28	SEQ ID NO.: 97.
SEQ ID NO.: 16	SEQ ID NO.: 29	
SEQ ID NO.: 17	SEQ ID NO.: 30	
SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 31	

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho marco aceptor humano comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 32
SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 33
SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 21	SEQ ID NO.: 34
SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 22	SEQ ID NO.: 92
SEQ ID NO.: 10	SEQ ID NO.: 23	SEQ ID NO.: 93
SEQ ID NO.: 11	SEQ ID NO.: 24	SEQ ID NO.: 94
SEQ ID NO.: 12	SEQ ID NO.: 25	SEQ ID NO.: 95
SEQ ID NO.: 13	SEQ ID NO.: 26	SEQ ID NO.: 96
SEQ ID NO.: 14	SEQ ID NO.: 27	Y
SEQ ID NO.: 15	SEQ ID NO.: 28	SEQ ID NO.: 97.
SEQ ID NO.: 16	SEQ ID NO.: 29	
SEQ ID NO.: 17	SEQ ID NO.: 30	
SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 31	

15. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha

234 219 232

proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de;

	SEQ ID NO.: 61	SEQ ID NO.: 62
SEQ ID NO.: 63	SEQ ID NO.: 69	SEQ ID NO.: 75
SEQ ID NO.: 64	SEQ ID NO.: 70	SEQ ID NO.: 76
SEQ ID NO.:65	SEQ ID NO.: 71	SEQ ID NO.:77
SEQ ID NO.: 66	SEQ ID NO.: 72	y
SEQ ID NO.: 67	SEQ ID NO.: 73	SEQ ID NO.: 78.
SEQ ID NO.:68	SEQ ID NO.:74	

16. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 15 en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de;

SEQ ID NO.: 61 & SEQ ID NO.: 62,
SEQ ID NO.: 63 & SEQ ID NO.: 64,
SEQ ID NO.: 65 & SEQ ID NO.: 66,
SEQ ID NO.: 67 & SEQ ID NO.: 68,
SEQ ID NO.: 69 & SEQ ID NO.: 70,
SEQ ID NO.: 71 & SEQ ID NO.: 72,
SEQ ID NO.: 73 & SEQ ID NO.: 74,
SEQ ID NO.:75 & SEQ ID NO.: 76,
SEQ ID NO. -.77 & SEQ ID NO.: 78
SEQ ID NO.: 67 & SEQ ID NO.: 70, Y
SEQ ID NO.: 69 & SEQ ID NO.: 68.

17. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de

Región de Marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

un residuo adyacente a una CDR;

un residuo de sitio de glicosilación;

un residuo raro;

un residuo capaz de interactuar con una subunidad p40 de IL-12 humana;

un residuo capaz de interactuar con una CDR;

un residuo canónico;

un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;

un residuo dentro de una zona Vernier;

y un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat.

18. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

un residuo adyacente a una CDR;

un residuo de sitio de glicosilación;

un residuo raro;

un residuo capaz de interactuar con una subunidad p40 de IL-12 humana;

un residuo capaz de interactuar con una CDR;

un residuo canónico;

un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;

un residuo dentro de una zona Vernier; y

un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat.

19. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado del grupo que consiste de:

un residuo adyacente a una CDR;

un residuo de sitio de glicosilación;

un residuo raro;

un residuo capaz de interactuar con una subunidad p40 de IL-12 humana;

un residuo capaz de interactuar con una CDR;

un residuo canónico;

un residuo de contacto entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera;

un residuo dentro de una zona Vernier; y

un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de cadena pesada variable definida por Chothia y un marco de cadena pesada primero definido por Kabat.

20. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el residuo clave seleccionado del grupo que consiste de 3H, 5H, 10H, 11H, 12H, 13H, 15H, 16H, 18H, 19H, 23H, 24H, 25H, 30H, 41H, 44H, 46H, 49H, 66H, 68H, 71H, 73H, 74H, 75H, 76H, 77H, 78H, 79H, 81H, 82H, 82AH, 82BH, 82CH, 83H, 84H, 85H, 86H, 87H, 89H, 93H, 98H, 108H, 109H, 1L, 2L, 3L, 7L, 8L, 9L, 10L, 11L, 12L, 13L, 15L, 17L, 19L, 20L, 21L, 22L, 36L, 41L, 42L, 43L, 45L, 46L, 58L, 60L, 62L, 63L, 67L, 70L, 73L, 74L, 77L, 78L, 79L, 80L, 83L, 85L, 87L, 104L, y 106L.

21. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el residuo clave seleccionado del grupo que consiste de 3H, 5H, 10H, 11H, 12H, 13H, 15H, 16H, 18H, 19H, 23H, 24H, 25H, 30H, 41H, 44H, 46H, 49H, 66H, 68H, 71H, 73H, 74H, 75H, 76H, 77H, 78H, 79H, 81H, 82H, 82AH, 82BH, 82CH, 83H, 84H, 85H, 86H, 87H, 89H, 93H, 98H, 108H, 109H, 1L, 2L, 3L, 7L, 8L, 9L, 10L, 11L, 12L, 13L, 15L, 17L, 19L, 20L, 21L, 22L, 36L, 41L, 42L, 43L, 45L, 46L, 58L, 60L, 62L, 63L, 67L, 70L, 73L, 74L, 77L, 78L, 79L, 80L, 83L, 85L, 87L, 104L, y 106L.

22. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el residuo clave seleccionado del grupo que consiste de 3H, 5H, 10H, 11H, 12H, 13H, 15H, 16H, 18H, 19H, 23H, 24H, 25H, 30H, 41H, 44H, 46H, 49H, 66H, 68H, 71H, 73H, 74H, 75H, 76H, 77H, 78H, 79H, 81H, 82H, 82AH, 82BH, 82CH, 83H, 84H, 85H, 86H, 87H, 89H, 93H, 98H, 108H, 109H, 1L, 2L, 3L, 7L, 8L, 9L, 10L, 11L, 12L, 13L, 15L, 17L, 19L, 20L, 21L, 22L, 36L, 41L, 42L, 43L, 45L, 46L, 58L, 60L, 62L, 63L, 67L, 70L, 73L, 74L, 77L, 78L, 79L, 80L, 83L, 85L, 87L, 104L, y 106L.

23. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

24. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

25. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la proteína de unión es un dominio variable humano de consenso.

26. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al

238 226

menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

27. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

28. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de amino ácido de Región de Marco, en donde la secuencia de amino ácido del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de amino ácido idénticos a dicho marco aceptor humano.

29. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 79	SEQ ID NO.: 88	SEQ ID NO.: 103
SEQ ID NO.: 80	SEQ ID NO.: 89	SEQ ID NO.: 104
SEQ ID NO.: 81	SEQ ID NO.: 90	SEQ ID NO.: 105
SEQ ID NO.: 82	SEQ ID NO.: 91	SEQ ID NO.: 106
SEQ ID NO.: 83	SEQ ID NO.: 98	SEQ ID NO.: 107
SEQ ID NO.: 84	SEQ ID NO.: 99	SEQ ID NO.: 108
SEQ ID NO.: 85	SEQ ID NO.: 100	y
SEQ ID NO.: 86	SEQ ID NO.: 101	SEQ ID NO.: 109.

229
~~239~~
239

SEQ ID NO.: 87 SEQ ID NO.: 102

30. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 29 en donde dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de amino ácido seleccionadas del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 67 & SEQ ID NO.:79,
SEQ ID NO.: 80 & SEQ ID NO.: 81,
SEQ ID NO.: 82 & SEQ ID NO.: 83,
SEQ ID NO.: 84 & SEQ ID NO.: 85,
SEQ ID NO.: 86 & SEQ ID NO.: 87,
SEQ ID NO.: 88 & SEQ ID NO.: 89,
SEQ ID NO.: 90 & SEQ ID NO.: 91,
SEQ ID NO.: 98 & SEQ ID NO.: 99,
SEQ ID NO.: 100 & SEQ ID NO.: 101,
SEQ ID NO.: 102 & SEQ ID NO.:103,
SEQ ID NO.: 104 & SEQ ID NO.: 105,
SEQ ID NO.: 106 & SEQ ID NO.: 107, Y
SEQ ID NO.: 108 & SEQ ID NO.: 109.

31. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de;

SEQ ID NO.: 79	SEQ ID NO.: 88	SEQ ID NO.: 103
SEQ ID NO.: 80	SEQ ID NO.: 89	SEQ ID NO.: 104
SEQ ID NO.: 81	SEQ ID NO.: 90	SEQ ID NO.: 105
SEQ ID NO.: 82	SEQ ID NO.: 91	SEQ ID NO.: 106
SEQ ID NO.: 83	SEQ ID NO.: 98	SEQ ID NO.: 107

275
228
240

SEQ ID NO.: 84	SEQ ID NO.: 99	SEQ ID NO.: 108
SEQ ID NO.: 85	SEQ ID NO.: 100	y
SEQ ID NO.: 86	SEQ ID NO.: 101	SEQ ID NO.: 109.
SEQ ID NO.: 87	SEQ ID NO.: 102	

32. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de;

SEQ ID NO.: 79	SEQ ID NO.: 88	SEQ ID NO.: 103
SEQ ID NO.: 80	SEQ ID NO.: 89	SEQ ID NO.: 104
SEQ ID NO.: 81	SEQ ID NO.: 90	SEQ ID NO.: 105
SEQ ID NO.: 82	SEQ ID NO.: 91	SEQ ID NO.: 106
SEQ ID NO.: 83	SEQ ID NO.: 98	SEQ ID NO.: 107
SEQ ID NO.: 84	SEQ ID NO.: 99	SEQ ID NO.: 108
SEQ ID NO.: 85	SEQ ID NO.: 100	y
SEQ ID NO.: 86	SEQ ID NO.: 101	SEQ ID NO.: 109.
SEQ ID NO.: 87	SEQ ID NO.: 102	

33. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de;

SEQ ID NO.: 79	SEQ ID NO.: 87	SEQ ID NO.: 101
SEQ ID NO.: 80	SEQ ID NO.: 87	SEQ ID NO.: 102
SEQ ID NO.: 81	SEQ ID NO.: 89	SEQ ID NO.: 103
SEQ ID NO.: 82	SEQ ID NO.: 90	SEQ ID NO.: 104
SEQ ID NO.: 83	SEQ ID NO.: 91	SEQ ID NO.: 105
SEQ ID NO.: 84	SEQ ID NO.: 98	SEQ ID NO.: 106
SEQ ID NO.: 85	SEQ ID NO.: 99	SEQ ID NO.: 107

241
259

SEQ ID NO.: 86 SEQ ID NO.: 100
SEQ ID NO.: 108 Y SEQ ID NO.: 109.

34. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
35. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
36. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
37. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
38. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
39. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.
40. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

272
240
242

41. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

42. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

43. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la proteína de unión es capaz de unirse a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

44. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

45. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

46. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

47. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la proteína de unión es capaz de neutralizar un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

228
241
243

48. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la proteína de unión es capaz de neutralizar un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

49. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la proteína de unión es capaz de neutralizar un objetivo seleccionado del grupo que consiste de IL-12 e IL-23.

50. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad on (Kon) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ medida por resonancia de plasmón superficial.

51. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad on (Kon) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ medida por resonancia de plasmón superficial.

52. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad on (Kon) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ medida por resonancia de plasmón superficial.

53. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 43, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad on (Kon) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: al menos aproximadamente $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ medida por resonancia de plasmón superficial.

54. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad off (Koff) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} ; medida por resonancia de plasmón superficial.

55. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad off (Koff) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} ; medida por resonancia de plasmón superficial.

56. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad off (Koff) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} ; medida por resonancia de plasmón superficial.

57. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 43, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de velocidad off (K_{off}) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-3}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-4}s^{-1} ; máximo aproximadamente 10^{-5}s^{-1} ; y máximo aproximadamente 10^{-6}s^{-1} ; medida por resonancia de plasmón superficial.

58. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M ; máximo aproximadamente 10^{-8} M ; máximo aproximadamente 10^{-9} M ; máximo aproximadamente 10^{-10} M ; máximo aproximadamente 10^{-11} M ; máximo aproximadamente 10^{-12} M ; y máximo aproximadamente 10^{-13} M ;

59. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M ; máximo aproximadamente 10^{-8} M ; máximo aproximadamente 10^{-9} M ; máximo aproximadamente 10^{-10} M ; máximo aproximadamente 10^{-11} M ; máximo aproximadamente 10^{-12} M ; y máximo aproximadamente 10^{-13} M ;

60. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicho objetivo seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M ; máximo aproximadamente 10^{-8} M ; máximo aproximadamente 10^{-9} M ; máximo aproximadamente 10^{-10} M ; máximo aproximadamente 10^{-11} M ; máximo aproximadamente 10^{-12} M ; y máximo aproximadamente 10^{-13} M ;

61. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 43, en donde dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a dicho objetivo

246-237
244

seleccionada del grupo que consiste de: máximo aproximadamente 10^{-7} M; máximo aproximadamente 10^{-8} M; máximo aproximadamente 10^{-9} M; máximo aproximadamente 10^{-10} M; máximo aproximadamente 10^{-11} M; máximo aproximadamente 10^{-12} M; y máximo aproximadamente 10^{-13} M;

62. Una construcción de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1-61, dicha construcción de anticuerpo comprende además un polipéptido enlazante o un dominio constante de inmunoglobulina.

63. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha proteína de unión es seleccionada del grupo que consiste de;

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| una molécula de inmunoglobulina, | Fv unido a disulfuro, |
| un anticuerpo monoclonal, | un scFv, |
| un anticuerpo quimérico, | un anticuerpo de dominio sencillo, |
| un anticuerpo con CDR injertada, | un diacuerpo, |
| un anticuerpo humanizado, | un anticuerpo multiespecífico, |
| un Fab, | un anticuerpo dual específico, y |
| un Fab', | un anticuerpo biespecífico. |
| un F(ab') ₂ , | |
| un Fv | |

64. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha proteína de unión comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de;

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| un dominio constante de IgM humana, | un dominio constante de IgG4 humana, |
| un dominio constante de IgG1 humana, | un dominio constante de IgE humana, |
| un dominio constante de IgG2 humana, | y |

un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgA humana.

65. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 62, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de:

SEQ ID NO.: 2 SEQ ID NO.:4 SEQ ID NO.:5,
SEQ ID NO.:3 y

66. Un conjugado de anticuerpo que comprende una construcción de anticuerpo descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 62-65, dicho conjugado de anticuerpo comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de; una molécula de inmuno adhesión, un agente de representación gráfica, un agente terapéutico, y un agente citotóxico.

67. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicho agente es un agente de representación gráfica seleccionado del grupo que consiste de un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminescente, un marcador bioluminescente, un marcador magnético, y biotina.

68. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicho agente de representación gráfica es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste de: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .

69. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste de; un anti-metabolito, un agente alquilante, un antibiótico,

233
246
248

un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente anti-mitótico, una antraciclina, toxina, y un agente apoptótico.

70. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 64, en donde dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.

71. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.

72. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha proteína de unión existe como un cristal.

73. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 62, en donde dicha construcción de anticuerpo existe como un cristal.

74. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicha construcción de anticuerpo existe como un cristal.

75. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 72, en donde dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de vehículo.

76. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de vehículo.

77. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de vehículo.

284
244
249

78. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 72, en donde dicha proteína de unión tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble de dicha proteína de unión.

79. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicha construcción de anticuerpo tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble de dicha construcción de anticuerpo.

80. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicho conjugado de anticuerpo tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble de dicho conjugado de anticuerpo.

81. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 72, en donde dicha proteína de unión retiene la actividad biológica.

82. La construcción de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicha construcción de anticuerpo retiene la actividad biológica.

83. El conjugado de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicho conjugado de anticuerpo retiene la actividad biológica.

84. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de amino ácido de la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1- 61.

85. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de amino ácido de la construcción de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 62-65.

86. Un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de amino ácido del conjugado de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 66-69.

275
280
250

87. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 84-86.
88. El vector de la reivindicación 87 en donde dicho vector es seleccionado del grupo que consiste de pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, y pBJ.
89. Una célula hospedera que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 87-88.
90. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 89, en donde dicha célula hospedera es una célula procariótica.
91. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 90, en donde dicha célula hospedera es E.Coli.
92. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 89, en donde dicha célula hospedera es una célula eucariótica.
93. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula eucariótica es seleccionada del grupo que consiste de célula de protisto, célula animal, célula de planta y célula fúngica.
94. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula eucariótica es una célula animal seleccionada del grupo que consiste de; una célula mamífera, una célula aviar, y una célula de insecto.
95. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula hospedera es una célula CHO.

96. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula hospedera es COS.
97. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula hospedera es una célula de levadura.
98. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 97, en donde dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
99. La célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 92, en donde dicha célula hospedera es una célula Sf9 de insecto.
100. Un método para producir una proteína capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12, que comprende cultivar una célula hospedera de una cualquiera de las reivindicaciones 89-99 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a la subunidad p40 de IL-12.
101. Una proteína producida de acuerdo con el método de la reivindicación 100.
102. Una composición para la liberación de una proteína de unión, dicha composición comprende:
- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína de unión cristalizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 72-83, y un ingrediente; y
 - (b) al menos un vehículo polimérico.

103. La composición de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado de uno o más del grupo que consiste de: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli (amino ácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona); poli (etilen glicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(organo)fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (vinil alcohol), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maléico – alquil vinil éter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

104. La composición de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dicho ingrediente es seleccionado del grupo que consiste de albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, metoxipolietilen glicol y polietilen glicol.

105. Un método para tratar un mamífero que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con la reivindicación 96.

106. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-61, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

107. La composición farmacéutica de la reivindicación 106, en donde dicho vehículo farmacéuticamente aceptable funciona como adyuvante útil para aumentar la absorción, o dispersión de dicha proteína de unión.

258
251
253

108. La composición farmacéutica de la reivindicación 107, en donde dicho adyuvante es hialuronidasa.

109. La composición farmacéutica de la reivindicación 106 que comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno en el cual la actividad de la IL-12 es perjudicial.

110. La composición farmacéutica de la reivindicación 109, en donde dicho agente adicional es seleccionado del grupo que consiste de: agente terapéutico, agente de representación gráfica, agente citotóxico, inhibidores de angiogénesis; inhibidores de quinasa; bloqueadores de molécula de co-estimulación; bloqueadores de molécula de adhesión; anticuerpo anti-citoquina o fragmento funcional del mismo; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcador o reportero detectable; un antagonista de TNF; un antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroidal (NSAID), un analgésico, un anesésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antisoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antisicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un antagonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

111. Un método para reducir la actividad de IL-12 humana que comprende contactar la IL-12 humana con la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-61 de forma que la actividad de IL-12 es reducida.

112. Un método para reducir la actividad de IL-12 humana en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el cual la actividad de IL-12 es perjudicial,

que comprende administrar al sujeto humano la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-61 de forma que se la actividad de IL-12 es reducida.

113. Un método para tratar un sujeto para una enfermedad o un trastorno en el cual la actividad de IL-12 es perjudicial administrando al sujeto la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-61 de forma que se logra el tratamiento.

114. El método de la reivindicación 113, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, artritis de Lyme, artritis soriática, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, soriasis, dermatitis escleroderma, enfermedad de injerto hospedero, rechazo de transplante de órgano, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con transplante de órgano, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasíticas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, malignancias, falla cardíaca, infarto al miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de distrés respiratorio del adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía soriática, artropatía

colítica ulcerativa, sinovitis enteropática, clamidia, atropatía asociada con yersinia y salmonella, espondiloartopatía, enfermedad ateromatosa/arteriosclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollar autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de célula gigante, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, falla ovárica, falla ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada con hemosiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármaco, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar infiltrante linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo 1 (hepatitis autoinmune clásica o lupoide), hepatitis autoinmune tipo 2 (hepatitis por anticuerpo anti-LKM), hipoglicemia mediada autoinmune, resistencia a la insulina tipo B con acanthosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune aguda asociada con transplante de

25624
254

órgano, enfermedad inmune crónica asociada con transplante de órgano, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, soriasis tipo 1, soriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal NOS, glomerulonefritides, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de la esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nudosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjörgren, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroide autoinmune, hipertiroidismo, hipertiroidismo autoinmune bocioso (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda vitiligo, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica, lesión hepática inducida por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrásica, hepatitis inducida por Fármaco, Esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección estreptocócica del grupo B (GBS), trastornos mentales (p.e., depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas Tipo Th1 y Tipo Th1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, seno, estómago, vejiga, colon, páncreas, ovario, próstata y rectal, y malignancias hematopoyéticas (leucemia y linfoma), Abetalipoproteinemia, Acrocianosis, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), infección bacteriana aguda o crónica, pancreatitis aguda, falla renal aguda, adenocarcinomas, latidos ectópicos aéreos, complejo de demencia del SIDA, hepatitis inducida por alcohol, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, rechazo de aloinjerto, deficiencia de alfa-1-antitripsina, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, angina de pecho, degeneración de célula del cuerno anterior, terapia anti cd3, síndrome antifosfolípido, reacciones de

hipersensibilidad anti-receptor, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, hipertensión arterial, arteriosclerosis, fístula arteriovenosa, ataxia, fibrilación auricular (sostenida o paroxismal), aleteo auricular, bloqueo atrioventricular, linfoma de célula B, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de médula espinal (BMT), bloqueo de rama de fascículo, linfoma de Burkitt, quemaduras, arritmias cardíacas, síndrome de aturdimiento cardíaco, tumores cardíacos, cardiomiopatía, respuesta de inflamación por by-pass cardiopulmonar, rechazo de trasplante de cartílago, degeneraciones corticales cerebelares, trastornos cerebelares, taquicardia auricular caótica o multifocal, trastornos asociados con la quimioterapia, leucemia mielocítica crónica (CML), alcoholismo crónico, patologías inflamatorias crónicas, leucemia linfocítica crónica (CLL), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), intoxicación crónica por salicilato, carcinoma colorrectal, falla cardíaca congestiva, conjuntivitis, dermatitis de contacto, cor pulmonale, enfermedad de arteria coronaria, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sepsis negativa de cultivo, fibrosis quística, trastornos asociados con la terapia de citoquina, Demencia pugilística, enfermedades de desmielinación, fiebre de dengue hemorrágico, dermatitis, condiciones dermatológicas, diabetes, diabetes mellitus, enfermedad aterosclerótica diabética, Enfermedad con cuerpo de Lewy difuso, cardiomiopatía congestiva dilatada, trastornos de los ganglios basales, Síndrome de Down en la madurez, trastornos de movimiento inducidos por fármaco, inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC, sensibilidad a fármacos, eccema, encefalomiелitis, endocarditis, endocrinopatía, epiglotitis, infección por virus de epstein-barr, eritromelalgia, trastornos extrapiramidales y cerebelares, linfocitosis hematofagocítica familiar, rechazo de implante del timo fetal, ataxia de Friedreich, trastornos arteriales periféricos funcionales, sepsis fúngica, gangrena gaseosa, úlcera gástrica, nefritis glomerular, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva, granulomas debidos a organismos intracelulares, leucemia de célula vellosa, enfermedad de Hallerorden-Spatz,

tiroiditis de hashimoto, fiebre del heno, rechazo de transplante de corazón, hemacromatosis, hemodiálisis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, hemorragia, hepatitis (A), arritmias His de fascículo, neuropatía por infección de VIH/VIH, enfermedad de Hodgkin, trastornos de movimiento hipercinéticos, reacciones de hipersensibilidad, neumonitis de hipersensibilidad, hipertensión, trastorno de movimientos hipocinéticos, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, enfermedad de Addison idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, citotoxicidad mediada por anticuerpo, Astenia, atrofia muscular espinal infantil, inflamación de la aorta, influenza a, exposición a radiación ionizante, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperfusión, ataque isquémico, artritis reumatoide juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, sarcoma de Kaposi, rechazo de transplante de tumor, legionella, leishmaniasis, lepra, lesiones del sistema corticoespinal, lipedema, rechazo de transplante de hígado, linfedema, malaria, Linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, meningitis, meningococemia, metabólica/idiopática, dolores de cabeza migrañosos, trastornos del multi sistema mitocondrial, enfermedad de tejido conectivo mixto, gammopatía monoclonal, mieloma múltiple, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager y Machado-Joseph), miastenia grave, micobacteria aviar intracelular, tuberculosis por micobacteria, síndrome mielodisplásico, infarto al miocardio, trastornos isquémicos del miocardio, carcinoma nasofaríngeo, enfermedad pulmonar crónica neonatal, nefritis, nefrosis, enfermedades neurodegenerativas, atrofia muscular neurogénica I, fiebre neutropénica, linfoma diferente de hodgkins, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos arteriales oclusivos, terapia con okt3, orquitis/epididimitis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, organomegalia, osteoporosis, rechazo de transplante de páncreas, carcinoma pancreático, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, rechazo de transplante de paratiroide, enfermedad inflamatoria pélvica, rinitis perenne, enfermedad pericardica, enfermedad aterlosclerótica periférica, trastornos

vasculares periféricos, peritonitis, anemia perniciosa, neumonía pneumocystis carinii, neumonía, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios de la piel), síndrome post perfusión, síndrome post bombeo, síndrome de cardiectomía post-MI, preeclampsia, Parálisis Supranuclear Progresiva, hipertensión pulmonar primaria, terapia de radiación, fenómeno y enfermedad de Raynaud, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Refsum, taquicardia con QRS estrecho regular, hipertensión renovascular, lesión por reperfusión, cardiomiopatía restrictiva, sarcomas, escleroderma, corea senil, Demencia senil del tipo cuerpo de Lewy, artropatías seronegativas, choque, anemia de célula de hoz, rechazo de aloinjerto de piel, síndrome de cambios de la piel, rechazo de trasplante de intestino delgado, tumores sólidos, arritmias específicas, ataxia espinal, degeneraciones espinocerebelares, miositis estreptocócica, lesiones estructurales del cerebelo, panencefalitis esclerosante subaguda, síncope, sífilis del sistema cardiovascular, anafalaxis sistémica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, artritis reumatoide juvenil de aparición sistémica, célula T o FAB ALL, Telangiectasia, tromboangitis obliterante, trombocitopenia, toxicidad, trasplantes, trauma/hemorragia, reacciones de hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, angina inestable, uremia, urosepsis, urticaria, enfermedades cardíacas valvulares, venas varicosas, vasculitis, enfermedades venosas, trombosis venosa, fibrilación ventricular, infecciones virales y fúngicas, encefalitis viral/meningitis aséptica, síndrome hemafagocítico viral asociado, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Wilson, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido.

115. Un método para tratar un paciente que sufre de un trastorno en el cual la IL-12 es perjudicial, que comprende el paso de administrar la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-61 antes, concurrente o después de la administración de un segundo agente, en donde el segundo agente es seleccionado del grupo que consiste de budenosida, factor de crecimiento

epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de MAP quinasa, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de la enzima convertidora de TNF α , inhibidores de señalización de célula T, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citoquina solubles, receptor de TNF p55 soluble, receptor TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β .

116. El método de acuerdo con la reivindicación 113, en donde dicha administración al sujeto es por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lacy, Susan E.
 Fung, Emma
 Belk, Jonathan P.
 Dixon, Richard W.
 Roguska, Michael
 Hinton, Paul R.
 Kumar, Shankar

<120> Proteínas de unión IL-12/P40

<130> 7825 US P1

<140> a ser asignada

<141> 2006-06-29

<150> US 60/695,679

<151> 2005-06-30

<160> 1.1.1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(326)

<223> Secuencia de la subunidad p40 de IL-12 e IL-23

<400> 1

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

Asp Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys
 35 40 45

Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser
 50 55 60

Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe
 65 70 75 80

Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser
 85 90 95

259
 261

His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr
 100 105 110

Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg
 115 120 125

Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr
 130 135 140

Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser
 145 150 155 160

Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu
 165 170 175

Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln
 180 185 190

Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val
 195 200 205

Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser
 210 215 220

Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
 225 230 235 240

Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr
 245 250 255

Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys
 260 265 270

Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe
 275 280 285

Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile
 290 295 300

Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp
 305 310 315 320

Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

247
260
262

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de la región constante de gamma-1 Ig humana

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

348
 267

349
 222
 264

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de la región constante de gamma-1 Ig mutante humana

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

280
 265
 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de la región constante de kappa Ig humana

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de la región Lambda Ig humana

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(30)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)
 <400> 6

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)
 <400> 7

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 32
 <212> PRT

282
 267

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(32)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 8

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10					15	

Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
		20						25					30		

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(11)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 9

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(30)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 10

Glu	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Glu
1				5					10					15	

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser
			20					25				30	

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

283
266
268

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(32)

<400> 11

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(30)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 13

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO

254
 267
 289

<222> (1)..(32)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 14

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(30)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(14)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(32)
 <223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

286
264
271

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(30)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(14)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(32)

<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 20

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(30)
<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(32)
<223> Secuencia de aceptar de cadena pesada (Humana)

<400> 22

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 23
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(23)
<223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

257
240
272

273 28
274

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(15)

<223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(32)

<223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 25

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(11)

<223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 26

274 279 270

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (12)..(23)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 27

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(15)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(32)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 29

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Ileu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

275 260
223

20

25

30

<210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(23)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(15)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(32)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 32

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

276 281
224

<210> 33
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(23)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(15)
 <223> Secuencia de Aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(119)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región LDH VH

<400> 35

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser
 20 25 30

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

277
282
278

35

40

45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Pro Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1) .. (108)
<223> Secuencia de amino ácido de la región LDH VH

<400> 36

Ser Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ile Ile Ser Thr Val Arg Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

278 283
276

100

105

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Raton

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(120)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región LDH VH

<400> 37

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Arg Ile Ala Thr Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Raton

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(108)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región LAG VL

<400> 38

279 264
~~279~~

Ser Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (11)..(117)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D8 VH

<400> 39

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Phe Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Arg Arg Phe Arg Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1) .. (108)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1DB VL

<400> 40

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO

<222> (1)..(117)

<223> Secuencia de amino ácido de la región 367 VH

<400> 41

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Phe Ser His Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Phe Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> Raton

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(108)

<223> Secuencia de amino ácido de la región 367 VL

<400> 42

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

282 287
239

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Thr Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Raton

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(117)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 5E8 VH

<400> 43

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Asp Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Arg Arg Arg Tyr Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

268
283
231

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(108)
<223> Secuencia de amino ácido de la región SE8 VL

<400> 44

Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln Arg
100 105

<210> 45
<211> 112
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(112)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1 VH

<400> 45

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

269
284
232

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Pro Asn Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Ileu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1) .. (108)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1 VL

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

285 270 283

<210> 47
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(117)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1H6 VH

<400> 47

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Met
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(108)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1H6 VL

<400> 48

286 234

Ser Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Thr Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1) .. (122)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 3A11 VH

<400> 49

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Phe Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Phe Gly Leu Leu Trp Asn Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 112
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(112)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 3A11 VL

<400> 50

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asp Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO

280 223
286

<222> (1)..(120)

<223> Secuencia de amino ácido de la región 4B4 VH

<400> 51

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		

Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ser	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				

Leu	Arg	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	

Phe	Leu	Arg	Ile	Ala	Thr	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85					90						95	

Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Arg	Val	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	

Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115						120

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Ratón

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(108)

<223> Secuencia de amino ácido de la región 4B4 VL

<400> 52

Ser	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp
			20					25					30		

Val	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

209224
222

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(118)
<223> Secuencia de amino ácido de la región 7G3 VH

<400> 53

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Val Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Tyr Ser Glu Tyr Ala Pro Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Ileu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Pro Gly Glu Leu Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

290 275
282

<210> 54
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(108)
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 7G3 VL

<400> 54

Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Lys Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Thr Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ile Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de
 concenso de IgG de ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa= Asp, Lys, Thr, Ser

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa= Tyr, Ser, Thr

291 276
289

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= Tyr, Val, Gly, Trp, Ser, Phe

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (4)..(4)
<223> Xaa= Ile, Met

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= His, Gly, Glu, Val

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (6)..(6)
<223> Xaa= Val o no está presente

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= Ser o no está presente

<400> 55

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 56
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de
concenso de IgG de ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = His, Asp, Gly, Trp, Ser, Tyr, Arg

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ile, Phe

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Tyr, Trp, Leu, Ser, Asn, Asp, Gly

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (4)..(4)

777
299
292

<223> Xaa = Trp, Pro, His, Thr, Ser

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Asp, Gly, Glu, Ala, Ile

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Thr, Asn

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Pro

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Lys, Asn, Ser, Glu, Thr, His

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Tyr, Thr, Pro, Ile, Asn

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = Tyr, Asn, Thr, His, Lys, Ser, Gly

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = Asn, Tyr

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (12)..(12)
<223> Xaa = Pro, Asn, Ala, Asp, Ser

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Ser, Glu, Asp, Pro

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Leu, Lys, Asp, Thr, Tyr

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (15)..(15)
<223> Xaa = Lys, Phe, Val, Met, Arg, Ala

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (16)..(16)
<223> Xaa = Ser, Lys, Gln, Pro, or Not Present

278
241

293

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = Asp, Gly, Arg, or Not Present

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = Phe, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa = Gln, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = Asp, o no está presente

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 57
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de
 concenso de IgG de ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa= Arg, Asn, Trp

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa= Gly, Thr, Arg, Pro, His

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa= Ile, Arg, Phe, Tyr, Gln

<220>

294279
272

<221> PEPTIDO
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa= Arg, Val,Tyr, Phe, Ala

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa= Ser, Asn, Gly, Ala, Arg

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa= Ala, Tyr, Leu, Phe, Met

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa= Met, Ala, Asp, Leu, Phe

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa= Asp, Met, Tyr, Trp

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa= Tyr, Asp, Asn

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa= Tyr, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa= Met, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa= Asp, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa= Tyr, o no está presente

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 58
 <211> 15

295 280
295

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de
concenso de IgG de ratón

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Lys o Arg

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ala

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Ser

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Gln, Glu

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Ser, Asn

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Val, Ile

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Ser, Gly, Asp

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Asn, Thr, Lys

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Asp, Asn, Tyr

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = Val, Gly, Leu

<220>
<221> PEPTIDO

296 281
~~294~~

<222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Ala, Ile, His

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = Ser, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Phe, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Met, o no está presente

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = Asn, o no está presente

<400> 58

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1			5				10						15	

<210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de concenso de IgG de ratón

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Tyr, Ser

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ala, Thr

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Ser, Ala

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (4)..(4)

282
297 295

<223> Xaa = Asn, His, Ser, Gln

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa = Arg, Asn, Ser

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa = Tyr, Gln, Ile

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa = Thr, Ser, Gly

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa = Ser, o no está presente

<400> 59

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino acido de ligando de afinidad a CDR de IL-12p40 de concenso de IgG de ratón

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa = Asp, Tyr, Ser

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa = Tyr, Asn, Lys, Ile

<220>

<221> PEPTIDO

298
293
246

<222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Asn, Thr, Ser, Glu

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Ser, Tyr, Val, Trp

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Pro

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Trp, Phe, Tyr, Leu, Pro

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = Thr, Ser

<400> 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 61
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.1 VH

<400> 61

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

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

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

299/299

Cys Ala Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.1 VL

<400> 62

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 63
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.2 VH

<400> 63

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

285
300
298

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser
20 25 30

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.2 VL

<400> 64

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

286
~~287~~
301

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 65
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.3 VH

<400> 65

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

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

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.3 VL

<400> 66

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

287
800
302

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 67
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.1 VH

<400> 67

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

288
303
301

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.1 VL

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 69
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.2 VH

<400> 69

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.2 VL

<400> 70

Gln Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

289

302

304

290
~~300~~
 305

<210> 71
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.1 VH

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.1 VL

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

306 299
704

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 73
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.2 VH

<400> 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 74
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

307292
308

<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.2 VL

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 75

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.1 VH

<400> 75

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Ser His Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

208 293
306

Met Glu Ileu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Phe Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.1 VL

<400> 76

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 77
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.2 VH

309 284

<400> 77

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Ser His Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Phe Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 78

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.2 VL

<400> 78

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

310 295
308

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.9 VL

<400> 79

Ser Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 80
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.6 VH

<400> 80

211 296
309

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

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

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.6 VL

<400> 81

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

297
310

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.7 VH

<400> 82

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser
20 25 30

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.7 VL

<400> 83

313 298
314

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 84
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.8 VH

<400> 84

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser
20 25 30

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

314
312
299

Cys Thr Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.8 VL

<400> 85

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.9 VH

<400> 86

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

315 380
313

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Lys Ser
20 25 30

Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1D4.9 VL

<400> 87

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

316 301
~~314~~

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.3 VH

<400> 88

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 89
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.3 VL

<400> 89

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

317302
215

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 90
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.3 VH

<400> 90

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Ser His Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Phe Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

313
246
303

<210> 91
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 3G7.3 VL

<400> 91

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 92
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(30)

<223> Secuencia de aceptor de cadena pesada (Humana)

<400> 92

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

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

<210> 93

319
318
304

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(11)
 <223> Secuencia de aceptor de cadena pesada (Humana)

<400> 93

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 94
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(30)
 <223> Secuencia de aceptor de cadena pesada (Humana)

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(11)
 <223> Secuencia de aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 95

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 96
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

320 395
518

<221> PEPTIDO
 <222> (1)..(32)
 <223> Secuencia de aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 96

Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(15)
 <223> Secuencia de aceptor de cadena ligera (Humana)

<400> 97

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 98
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.10 VH

<400> 98

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

396
321
~~219~~
2

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.10 VL

<400> 99

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 100
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.11 VH

<400> 100

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln

322 397
320

1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.11 VL

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

323 398
50

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 102
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.12 VH

<400> 102

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Thr Arg Val Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 1A6.12 VL

<400> 103

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

324 399
324

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 104
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.4 VH

<400> 104

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

325 310

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 105
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.4 VL

<400> 105

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gly Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 106
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.5 VH

<400> 106

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

326 317
~~324~~

35

40

45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 107

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.5 VL

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 108

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

327312
325

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.6 VH

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 109

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácido de la región 8E1.6 VL

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

228 3/15
226

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

```
<210> 110
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial
```

```
<220>
<223> Secuencia de aceptor de cadena pesada (Humana)
```

<400> 110

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

Val Gln Cys

```
<210> 111
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial
```

```
<220>
<223> Secuencia de aceptor de cadena ligera (Humana)
```

<400> 111

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys
20

329 324
2/24

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-02-28-119
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

The Commonwealth de Pennsylvania
William Francis Galvin
Secretario del Commonwealth

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 Malgorzata Pawlikowska
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Massachussets, cuya comisión expira el 11 de julio de 2014

Certificado

5. en Boston, Massachussets
6. el 28 de enero de 2008
7. por el Secretario del Commonwealth
8. No. 1282893
9. Sello/Estampilla
Gran Sello del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
William Francis Galvin
Secretario del Commonwealth

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 3177 / 89 MIN. JUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

000603
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO
SECRETARIA DE JUSTICIA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2008 MAR -11 A 12:19
SECRETARIA DE JUSTICIA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

330 3/15
3/8

Yo, Lisa Rasmussen, por el presente certifico que he comparado el documento original con la copia anexa del mismo; y que la copia anexa es en todo aspecto una copia fiel y correcta del documento original.

Fechado en Worcester, MA este día 23 de enero de 2008.

(firma: ilegible)
Lisa Rasmussen

COMMONWEALTH DE MASSACHUSSETS)
CONDADO DE WORCESTER)

En este día 23 de enero de 2008, ante mí compareció personalmente, Lisa Rasmussen, a quien conozco personalmente que es la persona nombrada en y quien firmó el instrumento anteriormente y reconoció que ella firmó el mismo como su acto y acción libre.

Notario Público
(firma: ilegible)
Mi Comisión Expira:

Malgorzata Pawlikowska
Notario Público
Commonwealth de Massachussets
Mi Comisión Expira el 11 de julio de 2014

331 326
329

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

25 de enero de 2007

PTAS

700307326A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE REEL Y FRAME CUYAS REFERENCIAS SE MENCIONAN MAS ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN

332 377
377

TRASPASO

Yo/Nosotros,

- (1) Paul R. Hinton, y
- (2) Shankar Kumar

residentes, respectivamente, en

- (1) 321 Dunsmuir Terrace #4, Sunnyvale, CA 94085 (EU)
- (2) 3930 Kral Place, Pleasanton, CA 94588 (EU)

por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de lo cual se reconoce por el presente, hemos cedido, vendido y transferido a y por el presente cedemos, vendemos y transferimos a PDL BioPharma, Inc. una sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de California y que tiene su oficina y lugar de negocios en 34801 Campus Drive, Fremont, CA 94555, EU, sus sucesores y cesionarios:

1) todo derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países en todo el mundo y de cualquiera y todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos revelados en la Solicitud de los Estados Unidos No. de Serie 11/478.096, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No. 7825.USP1} y Solicitud Internacional No. Serie PCT/US2006/25584, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No. 7825.WO.O1} y designando a AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH y LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,

333 318

RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW; todos facultados: PROTEÍNAS DE UNION A IL-12/P40", incluyendo cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión, continuación y división de la misma, y cualquier solicitud de sustitución de la misma;

2) el derecho completo y pleno para presentar solicitudes de patente en nombre de PDL BioPharma, Inc., la persona que designe, o en mi nombre a elección de PDL BioPharma, Inc., o la persona que designe, sobre las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriormente mencionadas en todos los países del mundo;

3) el derecho completo y pleno, título e interés en y de cualquier Patente de Invención que pueda expedirse sobre ella en los Estados Unidos y en cualquier otro país del mundo y cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión de la misma; y

4) todo el derecho, título e interés en toda Convención y Derechos de Tratados de toda clase sobre ella incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y de las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriores.

Por el presente autorizamos y le solicitamos a las autoridades competentes que otorguen y expidan cualquiera y todas las Patentes de Invención en los Estados Unidos y en todo el mundo a PDL BioPharma, Inc. como el cesionario de todo derecho, título e interés en ello, tan completa y plenamente como si el mismo hubiese sido tenido y disfrutado por nosotros si este traspaso, venta y transferencia no se hubiese hecho.

334 379
35

Y además acordamos, en cualquier momento, cuando sea solicitado por PDL BioPharma, Inc., ejecutar y entregar a PDL BioPharma, Inc. cualquier solicitud adicional para patentes para dichas invenciones y descubrimientos, o cualquier parte o partes de ella, y cualquier solicitud para patente de confirmación, registro y base de importación de cualquier Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, recuperaciones, reemisiones, reexámenes o extensiones de ello.

Y además acordamos, en cualquier momento, ejecutar o entregar cuando sea solicitado a PDL BioPharma, Inc. dichos documentos adicionales, si hubiese, según sean necesarios o deseables para asegurar la protección de patente sobre dichas invenciones, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo, y de lo contrario hacer lo que sea necesario para darle pleno efecto a y perfeccionar los derechos de PDL BioPharma, Inc. bajo este Traspaso, incluyendo la ejecución, entrega y obtención de cualquier y todos los documentos adicionales que evidencien este traspaso, transferencia y venta según sea necesario o deseable.

CEDENTES:

- (1) (firma: ilegible)
Paul R. HINTON

RECONOCIMIENTO:

En este día 24 de octubre de 2006, Paul R. HINTON compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho

335 320
335

Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

(2) (firma: ilegible)

Shankar KUMAR

RECONOCIMIENTO:

En este día 25 de octubre de 2006, Shankar KUMAR compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

336 387
~~334~~

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

25 de enero de 2007

PTAS

700307385A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE REEL Y FRAME CUYAS REFERENCIAS SE MENCIONAN MAS ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN

337 322

ESTA NOTIFICACION EN EL TELEFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVIE
LAS SOLICITUDES DE CORRECCION A: U.S. PATENT AND TRADEMARK
OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450,
ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 01/23/2007

REEL /FRAME: 018801/0952

NUMERO DE PAGINAS: 5

RESUMEN: TRASPASO DE LOS INTERESES DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO
PARA DETALLES).

CEDENTE:

PDL BIOPHARMA, INC..

FECHA DEL DOCUMENTO: 10/25/2006

CESIONARIO:

ABBOTT LABORATORIES

100 ABBOTT PARK ROAD

ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

NUMERO SERIAL: 11478096

FECHA DE PRESENTACIÓN: 06/29/2006

NUMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TITULO: PROTEÍNAS DE UNION A IL-12/P40

338 32/3
1576

TRASPASO

Yo/Nosotros,

PDL BioPharma, Inc.

residente en

34801 Campus Drive, Fremont, CA 94555 (EU)

por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de lo cual se reconoce por el presente, hemos cedido, vendido y transferido a y por el presente cedemos, vendemos y transferimos a Abbott Laboratories, una sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Illinois y que tiene su oficina y lugar de negocios en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

1) todo derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países en todo el mundo y de cualquiera y todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos revelados en la Solicitud de los Estados Unidos No. de Serie 11/478.096, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No. 7825.USP1} y Solicitud Internacional No. Serie PCT/US2006/25584, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No. 7825.WO.O1} y designando a AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH y LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW; todos facultados: PROTEÍNAS DE

339.374
147

UNION A IL-12/P40", incluyendo cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión, continuación y división de la misma, y cualquier solicitud de sustitución de la misma;

2) el derecho completo y pleno para presentar solicitudes de patente en nombre de Abbott Laboratories, la persona que designe, o en mi nombre a elección de Abbott Laboratories, o la persona que designe, sobre las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriormente mencionados en todos los países del mundo;

3) el derecho completo y pleno, título e interés en y de cualquier Patente de Invención que pueda expedirse sobre ella en los Estados Unidos y en cualquier otro país del mundo y cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión de la misma; y

4) todo el derecho, título e interés en toda Convención y Derechos de Tratados de toda clase sobre ella incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y de las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriores.

Por el presente autorizamos y le solicitamos a las autoridades competentes que otorguen y expidan cualquiera y todas las Patentes de Invención en los Estados Unidos y en todo el mundo a Abbott Laboratories como el cesionario de todo derecho, título e interés en ello, tan completa y plenamente como si el mismo hubiese sido tenido y disfrutado por nosotros si este traspaso, venta y transferencia no se hubiese hecho.

340 325

Y además acordamos, en cualquier momento, cuando sea solicitado por Abbott Laboratories, ejecutar o entregar a Abbott Laboratories cualquier solicitud adicional para patentes para dichas invenciones y descubrimientos, o cualquier parte o partes de ella, y cualquier solicitud para patente de confirmación, registro e importación con base en la Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, recuperaciones, reemisiones, reexámenes o extensiones de ello.

Y además acordamos, en cualquier momento, ejecutar o entregar cuando sea solicitado a Abbott Laboratories dichos documentos adicionales, si hubiese, según sean necesarios o deseables para asegurar la protección de patente sobre dichas invenciones, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo, y de lo contrario hacer lo que sea necesario para darle pleno efecto a y perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories bajo este Traspaso, incluyendo la ejecución, entrega y obtención de cualquiera y todos los documentos adicionales que evidencien este traspaso, transferencia y venta según sea necesario o deseable.

CEDENTES:

- (1) (firma: ilegible)
Cynthia Shumate
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
PDL BioPharma, Inc.

RECONOCIMIENTO:

341 326
~~341~~

En este día 25 de octubre de 2006, Cynthia Shumate, Vicepresidente, Propiedad Intelectual de PDL BioPharma, Inc., y autorizada para firmar en nombre de PDL BioPharma, Inc., compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

342 327
310

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

25 de enero de 2007

PTAS

700307420A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE REEL Y FRAME CUYAS REFERENCIAS SE MENCIONAN MAS ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN

343 328
~~343~~

ESTA NOTIFICACION EN EL TELEFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVIE
LAS SOLICITUDES DE CORRECCION A: U.S. PATENT AND TRADEMARK
OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450,
ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 01/23/2007

REEL /FRAME: 018803/0443

NUMERO DE PAGINAS: 4

RESUMEN: TRASPASO DE LOS INTERESES DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO
PARA DETALLES).

CEDENTE:

LACY, SUSAN E.

FECHA DEL DOCUMENTO: 11/09/2006

CEDENTE:

FUNG, EMMA

FECHA DEL DOCUMENTO: 11/09/2006

CEDENTE:

BELK, JONATHAN P.

FECHA DEL DOCUMENTO: 11/09/2006

CEDENTE:

DIXON, RICHARD W.

FECHA DEL DOCUMENTO: 11/13/2006

CEDENTE:

ROGUSKA, MICHAEL

FECHA DEL DOCUMENTO: 10/31/2006

CESIONARIO:

ABBOTT LABORATORIES

100 ABBOTT PARK ROAD

ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

NUMERO SERIAL: 11478096

FECHA DE PRESENTACIÓN: 06/29/2006

NUMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TITULO: PROTEÍNAS DE UNION A IL-12/P40

329
344
342

KIMBERLY WHITE, EXAMINADOR
DIVISION DE SERVICIOS DE TRASPASO
DIVISION DE REGISTROS PUBLICOS

345 330
242

TRASPASO

Yo/Nosotros,

- (1) Susan E. Lacy
- (2) Emma Fung
- (3) Jonathan P. Belk
- (4) Richard W. Dixon
- (5) Michael Roguska, y

residentes, respectivamente, en

- (1) 313 Maple Avenue, Shrewsbury, MA 01545 (EU)
- (2) 14 Ptarmigan Drive, Shrewsbury, MA 01545 (EU)
- (3) 89 Beaman Road, Sterling, MA 01564 (EU)
- (4) 19 Nottingham Drive, Jefferson, MA 01522 (EU)
- (5) 16 Hilldale Road, Ashland, MA 01721 (EU), y

por una contraprestación buena y valiosa, el recibo de lo cual se reconoce por el presente, hemos cedido, vendido y transferido a y por el presente cedemos, vendemos y transferimos a Abbott Laboratories, una sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Illinois y que tiene su oficina y lugar de negocios en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, sus sucesores y cesionarios:

1) todo derecho, título e interés en los Estados Unidos y en todos los países en todo el mundo y de cualquiera y todas mis/nuestras invenciones y descubrimientos revelados en la Solicitud de los Estados Unidos No. de Serie 11/478.096, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No.

346 381
344

7825.USP1} y Solicitud Internacional No. Serie PCT/US2006/25584, presentada el 29 de junio de 2006 {Expediente Apoderado No. 7825.WO.O1} y designando a AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH y LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM y ZW; todos facultados: PROTEÍNAS DE UNION A IL-12/P40", incluyendo cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión, continuación y división de la misma, y cualquier solicitud de sustitución de la misma;

2) el derecho completo y pleno para presentar solicitudes de patente en nombre de Abbott Laboratories, la persona que designe, o en mi nombre a elección de Abbott Laboratories, o la persona que designe, sobre las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriormente mencionados en todos los países del mundo;

3) el derecho completo y pleno, título e interés en y de cualquier Patente de Invención que pueda expedirse sobre ella en los Estados Unidos y en cualquier otro país del mundo y cualquier renovación, recuperación, reemisión, reexamen, extensión de la misma; y

4) todo el derecho, título e interés en toda Convención y Derechos de Tratados de toda clase sobre ella incluyendo sin limitación todos los derechos de prioridad en cualquier país del mundo, en y de las invenciones, descubrimientos y solicitudes anteriores.

347 332
345

Por el presente autorizamos y le solicitamos a las autoridades competentes que otorguen y expidan cualquiera y todas las Patentes de Invención en los Estados Unidos y en todo el mundo a Abbott Laboratories como el cesionario de todo derecho, título e interés en ello, tan completa y plenamente como si el mismo hubiese sido tenido y disfrutado por nosotros si este traspaso, venta y transferencia no se hubiese hecho.

Y además acordamos, en cualquier momento, cuando sea solicitado por Abbott Laboratories, ejecutar o entregar a Abbott Laboratories cualquier solicitud adicional para patentes para dichas invenciones y descubrimientos, o cualquier parte o partes de ella, y cualquier solicitud para patente de confirmación, registro e importación con base en la Patente de Invención que se expida sobre dichas invenciones, descubrimientos o solicitudes, y divisiones, continuaciones, renovaciones, recuperaciones, reemisiones, reexámenes o extensiones de ello.

Y además acordamos, en cualquier momento, ejecutar o entregar cuando sea solicitado a Abbott Laboratories dichos documentos adicionales, si hubiese, según sean necesarios o deseables para asegurar la protección de patente sobre dichas invenciones, descubrimientos y solicitudes en todos los países del mundo, y de lo contrario hacer lo que sea necesario para darle pleno efecto a y perfeccionar los derechos de Abbott Laboratories bajo este Traspaso, incluyendo la ejecución, entrega y obtención de cualquier y todos los documentos adicionales que evidencien este traspaso, transferencia y venta según sea necesario o deseable.

CEDENTES:

- (1) (firma: ilegible)
Susan E. Lacy

383
748
748

RECONOCIMIENTO:

En este día 9 de noviembre de 2006, Susan E. LACY compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

(2) (firma: ilegible)

Emma FUNG

RECONOCIMIENTO:

En este día 9 de noviembre de 2006, Emma FUNG compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

(3) (firma: ilegible)

334
349

Jonathan P. BELK

RECONOCIMIENTO:

En este día 9 de noviembre de 2006, Jonathan P. BELK compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

(4) (firma: ilegible)

Richard W. DIXON

RECONOCIMIENTO:

En este día 13 de noviembre de 2006, Richard W. DIXON compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

350 335
RUB

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

(5) (firma: ilegible)

Michael ROGUSKA

RECONOCIMIENTO:

En este día 31 de octubre de 2006, Michael ROGUSKA compareció personalmente ante mí, ejecutó el Traspaso anterior, y reconoció debidamente ante mí que dicho Traspaso fue ejecutado como un acto y acción libres de su parte para los usos y fines ahí expresados.

(firma: ilegible)

Firma del testigo

(firma: ilegible)

Nombre del testigo (favor letra imprenta)

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 28 de febrero de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

351 336
~~344~~

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by: Malgorzata Pawlikowska

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: the State of Massachusetts

whose commission expires on: July 11, 2014

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 28 January, 2008

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1282893

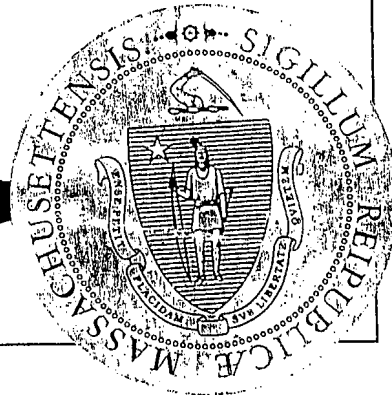
9. Seal/stamp:

Great Seal of the Commonwealth

10. Signature:

William Francis Galvin

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



352 337
350

I, Lisa Rasmussen, hereby certify that I have compared the original document with the annexed copy thereof; and that the annexed copy is in all respects a true and accurate copy of the said original document.

Dated at Worcester, MA this 23 day of January, 2008.

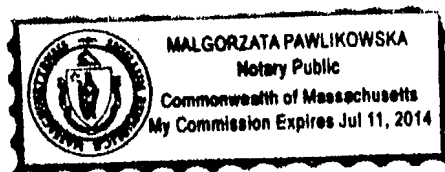
Lisa Rasmussen
Lisa Rasmussen

COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS)

COUNTY OF WORCESTER) ss.

On January 23, 2008 before me personally appeared,
Lisa Rasmussen, personally known to me to be the person named in and who executed the foregoing instrument and acknowledged that she executed the same as her free act and deed.

NOTARY PUBLIC
Malgorzata Pawlikowska
My Commission Expires:





353
328
15

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 25, 2007

PTAS

700307326A

700307326A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/23/2007

REEL/FRAME: 018802/0492
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:
HINTON, PAUL R.

DOC DATE: 10/24/2006

ASSIGNOR:
KUMAR, SHANKAR

DOC DATE: 10/25/2006

ASSIGNEE:
PDL BIOPHARMA, INC.
34801 CAMPUS DRIVE
FREMONT, CALIFORNIA 94555

SERIAL NUMBER: 11478096
PATENT NUMBER:
TITLE: IL-12/P40 BINDING PROTEINS

FILING DATE: 06/29/2006
ISSUE DATE:

354 33-9
7/2

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Paul R. Hinton, and
- (2) Shankar Kumar

residing, respectively, at

- (1) 321 Dunsmuir Terrace #4, Sunnyvale, CA 94085 (US), and
- (2) 3930 Kral Place, Pleasanton, CA 94588 (US)

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to PDL BioPharma, Inc., a corporation organized and existing under the laws of the State of California and having an office and a place of business at 34801 Campus Drive, Fremont, CA 94555, USA, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 11/478,096, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.US.P1} and International Application Ser. No. PCT/US2006/25584, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.WO.O1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; both entitled: "IL-12/p40 BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of PDL BioPharma, Inc., its designee, or in my name at the election of PDL BioPharma, Inc. or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to PDL BioPharma, Inc. as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of PDL BioPharma, Inc., to execute and to deliver PDL BioPharma, Inc. any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or a part thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

355 346
355

We further agree at any time to execute and to deliver upon request to PDL BioPharma, Inc. such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of PDL BioPharma, Inc. under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNORS:

(1) Paul R. Hinton
Paul R. HINTON

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 24th day of October, 2006, Paul R. HINTON personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Linda Pete
Witness signature

LINDA Pete
Witness name (please print)

(2) Shankar KUMAR
Shankar KUMAR

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 25th day of October, 2006, Shankar KUMAR personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Linda Pete
Witness signature

LINDA Pete
Witness name (please print)



356 341
254

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 25, 2007

PTAS

700307385A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

700307385A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/23/2007

REEL/FRAME: 018801/0952
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

PDL BIOPHARMA, INC.

DOC DATE: 10/25/2006

ASSIGNEE:

ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

SERIAL NUMBER: 11478096

FILING DATE: 06/29/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: IL-12/P40 BINDING PROTEINS

357 342
355

ASSIGNMENT

I/We,

PDL BioPharma, Inc.,

residing at

34801 Campus Drive, Fremont, CA 94555, (US),

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 11/478,096, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.US.P1} and International Application Ser. No. PCT/US2006/25584, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.WO.O1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; all entitled: "IL-12/p40 BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds thereon, including without limitation all rights of priority in any country of the world, in and to the above inventions, discoveries and applications.

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

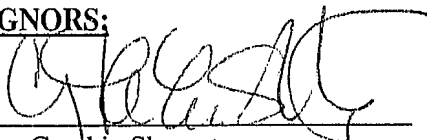
We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions.

358 343
25/11

discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNORS:

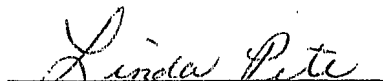
(1)



Cynthia Shumate
Vice President, Intellectual Property
PDL BioPharma, Inc.

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 25 day of October, 2006, Cynthia Shumate, **Vice President, Intellectual Property** of PDL BioPharma, Inc., and authorized to sign on behalf of PDL BioPharma, Inc., personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.


Witness signature

Linda Pete
Witness name (please print)



359 344
307

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 25, 2007

PTAS

700307420A

TARA SESHADRI
ABBOTT BIORESEARCH CENTER
100 RESEARCH DRIVE
WORCESTER, MA 01605-4314

700307420A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/23/2007

REEL/FRAME: 018803/0443
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

LACY, SUSAN E.

DOC DATE: 11/09/2006

ASSIGNOR:

FUNG, EMMA

DOC DATE: 11/09/2006

ASSIGNOR:

BELK, JONATHAN P.

DOC DATE: 11/09/2006

ASSIGNOR:

DIXON, RICHARD W.

DOC DATE: 11/13/2006

ASSIGNOR:

ROGUSKA, MICHAEL

DOC DATE: 10/31/2006

345
360
36

ASSIGNEE:

ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064

SERIAL NUMBER: 11478096
PATENT NUMBER:
TITLE: IL-12/P40 BINDING PROTEINS

FILING DATE: 06/29/2006
ISSUE DATE:

KIMBERLY WHITE, EXAMINER
ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

361
359
346

ASSIGNMENT

I/We,

- (1) Susan E. Lacy,
- (2) Emma Fung,
- (3) Jonathan P. Belk,
- (4) Richard W. Dixon,
- (5) Michael Roguska, and

residing, respectively, at

- (1) 313 Maple Avenue, Shrewsbury, MA 01545 (US),
- (2) 14 Ptarmigan Drive, Shrewsbury, MA 01545 (US),
- (3) 89 Beaman Road, Sterling, MA 01564 (US),
- (4) 19 Nottingham Drive, Jefferson, MA 01522 (US),
- (5) 16 Hilldale Road, Ashland, MA 01721 (US), and

for good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, have assigned, sold and transferred to and do hereby assign, sell and transfer to Abbott Laboratories, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois and having an office and a place of business at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, its successors and assigns:

1) the entire right, title and interest in the United States and in all countries throughout the world in and to any and all my/our inventions and discoveries disclosed in United States Application Ser. No. 11/478,096, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.US.P1} and International Application Ser. No. PCT/US2006/25584, filed 29 June 2006 {Atty. Docket No. 7825.WO.O1} and designating AP, EA, EP, OA, AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BE, BF, BG, BJ, BR, BY, BZ, CA, CF, CG, CH and LI, CI, CM, CN, CO, CR, CU, CY, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GA, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GQ, GR, GW, HR, HU, ID, IE, IL, IN, IS, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MC, MD, MG, MK, ML, MN, MR, MW, MX, MZ, NE, NI, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, SY, SZ, TD, TG, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, VC, ZA, ZM and ZW; both entitled: "IL-12/p40 BINDING PROTEINS", including any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions, continuations and divisions thereof, and any substitute applications therefor;

2) the full and complete right to file patent applications in the name of Abbott Laboratories, its designee, or in my name at the election of Abbott Laboratories or its designee, on the aforesaid inventions, discoveries and applications in all countries of the world;

3) the entire right, title and interest in and to any Letters Patent which may issue thereon in the United States or in any other country of the world and any renewals, revivals, reissues, reexaminations, extensions of the same; and

4) the entire right, title and interest in all Convention and Treaty Rights of all kinds to and to the above inventions and applications.

347
36.2

We hereby authorize and request the competent authorities to grant and to issue any and all such Letters Patent in the United States and throughout the world to Abbott Laboratories as the assignee of the entire right, title and interest therein, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us had this assignment, sale and transfer not been made.

We further agree, at any time, upon the request of Abbott Laboratories, to execute and to deliver to Abbott Laboratories any additional applications for patents for said inventions and discoveries, or any part or parts thereof, and any applications for patents of confirmation, registration and importation based on any Letters Patent issuing on said inventions, discoveries or applications, and divisions, continuations, renewals, revivals, reissues, reexaminations and extensions thereof.

We further agree at any time to execute and to deliver upon request to Abbott Laboratories such additional documents, if any, as are necessary or desirable to secure patent protection on said inventions, discoveries and applications throughout all countries of the world, and otherwise to do the necessary to give full effect to and to perfect the rights of Abbott Laboratories under this Assignment, including the execution, delivery and procurement of any and all further documents evidencing this assignment, transfer and sale as may be necessary or desirable.

ASSIGNORS:

(1) Susan E. Lacy
Susan E. LACY

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 9th day of Nov, 2006, Susan E. LACY personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Dorothy Jacques
Witness signature

Dorothy Jacques
Witness name (please print)

(2) Emma Fung
Emma FUNG

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 9th day of Nov, 2006, Emma FUNG personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Dorothy Jacques
Witness signature

Dorothy Jacques
Witness name (please print)

363 348
76
(3) Jonathan P. BELK

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 9th day of NOV, 200⁸, Jonathan P. BELK personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Dorothy Jacques
Witness signature

Dorothy Jacques
Witness name (please print)

(4) Richard W. DIXON

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 13th day of November, 200⁸, Richard W. DIXON personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Lisa Rasmussen
Witness signature

Lisa Rasmussen
Witness name (please print)

(5) Michael ROGUSKA

ACKNOWLEDGEMENT:

On this 31 day of OCTOBER, 200⁸, Michael ROGUSKA personally appeared before me, executed the foregoing Assignment, and duly acknowledged to me that such Assignment was executed by his/her free act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Maria E. Palao
Witness signature

MARIA E. PALAO
Witness name (please print)