



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

(21) **PI0806605-1 A2**

(22) Data de Depósito: 16/01/2008  
(43) Data da Publicação: 06/09/2011  
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.:*  
A01N 37/18  
A61K 38/00

(54) **Título:** MÉTODOS PARA TRATAR PSORÍASE

(30) **Prioridade Unionista:** 16/01/2007 US 60/880,767,  
27/02/2007 US 60/904,022, 24/04/2007 US 60/925,960, 24/07/2007  
US 60/961,764, 28/09/2007 US 60/997,012, 27/02/2007 US  
60/904,022, 27/02/2007 US 60/904,022, 24/04/2007 US 60/925,960,  
28/09/2007 US 60/997,012, 24/04/2007 US 60/925,960, 24/07/2007  
US 60/961,764

(73) **Titular(es):** Abbott Laboratories

(72) **Inventor(es):** Alexandra B. Kimball, Elliot Keith Chartash,  
Joaquim Mario Valdes, Susan K. Paulson, William T. Barchuk

(74) **Procurador(es):** Nellie Anne Daniel-Shores

(86) **Pedido Internacional:** PCT US08000564 de 16/01/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/088823de  
24/07/2008

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA TRATAR PSORÍASE. A invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente por administração a um paciente de um anticorpo capaz de se ligar à subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23.



PI0806605-1

“MÉTODOS PARA TRATAR PSORÍASE”

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos EUA No. 60/880.767, depositado em 16 de Janeiro de 2007; Pedido Provisório dos EUA No. 60/904.022, depositado em 27 de Fevereiro de 2007; Pedido Provisório dos EUA No. 60/925.960, depositado em 24 de Abril de 2007; Pedido Provisório dos EUA No. 60/961.764, depositado em 24 de Julho de 2007; e Pedido Provisório dos EUA No. 60/997.012, depositado em 28 de Setembro de 2007, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são aqui incorporados por referência.

10 ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

Psoríase é uma doença inflamatória mediada por célula T que é considerada ser uma das doenças autoimunes mais comuns, afetando aproximadamente 2% a 3% de adultos, though a prevalência global varia amplamente (Stern R.S., *et al*, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2004, 9: 136-39; Davidson A e Diamond. B. N. *Engl. J. Med.* 2001, 345:340-50; Langley R. G. B., *et al*, *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64 (Suplem. II): ii18-23). Psoríase tem impacto maior na qualidade de vida (de Korte J., *et al*, *J. Investig Dermatol Symp Proc* 2004, 9:140-7; Krueger G., *et al*, *Arch Dermatol* 2001, 137:280-4; Finlay AY e Coles EC, *Br J Dermatol* 1005, 132: 236-44) e é associado com um número de problemas psicossociais (Kimball AB, *Am J Clin Dermatol* 2005, 6:383-92; Russo PA *et al*, *Australas J Dermatol* 2004, 45: 155-9). Muitas terapias de psoríase tradicionais têm efeitos adversos tóxicos; assim, seu uso em longo prazo é limitado (Lebwohl M. e Ali S., *J Am Acad Dermatol* 2001, 45:487-98; Lebwohl M. e Ali S., *J Am Acad Dermatol* 2001, 45:649-61). Em adição, muitos pacientes com psoríase estão insatisfeitos com terapias tradicionais (Stern RS, *et al*, *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004, 9:136-30; Finlay AY e Ortonne JP, *J Cutan Med Surg* 2004, 8:310-20); então, existe uma necessidade clara para terapias que são seguros e mais fáceis para usar e que podem ser prescritos em uma base de longo prazo.

Interleucina 12 (IL-12) e a citocina relacionada IL-23 são membros da superfamília IL-12 de citocinas que dividem uma subunidade p40 em comum (Anderson EJR, *et al*, *Springer Semin Immunopathol* 2006, 27: 425-42). Ambas as citocinas contribuem para o desenvolvimento da resposta imune celular auxiliadora T (Th1) do tipo 1 em psoríase, mas cada uma tem um papel único (Rosmarin D e Strober BE, *J Drugs Dermatol* 2005, 4:318-25; Hong K., *et al*, *J Immunol* 1999, 162:7480-91; Yawalkar N, *et al*, *J Invest Dermatol* 1998, 111:1053-57). IL-12 primariamente estimula a diferenciação de células Th1 e a subsequente secreção de interferon-gama, enquanto IL-23 preferivelmente estimula a diferenciação de células T naive em células T auxiliadoras efetoras (Th17) que secretam IL-17, um mediador pró-inflamatório (Rosmarin D e Strober BE, *J Drigs Dermatol* 2005, 4:318-25; Harrington Le *et al*, *Nature Immunol* 2005, 6:1123-32; Park H, *et al*, *Nature Immunol* 2005, 6: 1132-41). A

superexpressão de RNA mensageiro de IL-12 p40 e IL-23 p40 em lesões de pele psoriáticas sugere que a inibição de IL-12 e IL-23 com um anticorpo neutralizante para a proteína da subunidade p40 IL-12/IL-23 pode oferecer uma abordagem terapêutica efetiva para o tratamento da psoríase (Yawalkar N, *et al*, J Invest Dermatol 1998, 111:1053-57; Lee E, *et al*, J Exp Med 2004, 199: 125-30; Shaker OG, *et al*, Clin Biochem 2006, 39:119-25; Piskin G, *et al*, J Immunol 2006, 176: 1908-15). Tais abordagens terapêuticas para o tratamento de psoríase são claramente necessárias na técnica.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê métodos e composições para tratar psoríase, por exemplo, psoríase crônica, utilizando um anticorpo, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que se liga a IL-12 humana e/ou IL-23 humana.

Em um aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo a administração a um paciente quinzenalmente, semanalmente ou dose única de um anticorpo, ou uma porção de ligação do antígeno do mesmo, direcionado contra IL-12 e/ou IL-23 humana.

Em uma modalidade, o paciente mantém uma resposta quinzenalmente, semanalmente ou dose única do anticorpo, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, por um período estendido, por exemplo, por pelo menos cerca de 12 semanas ou por pelo menos cerca de 24 semanas.

Em outra modalidade, o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 75 por um período prolongado seguindo uma dose quinzenalmente, semanalmente ou única de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, direcionado contra a IL-12 humana e IL-23 humana ao paciente. Em ainda outra modalidade, o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 90 por um período prolongado seguindo uma dose quinzenalmente, semanalmente ou dose única de um anticorpo, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, direcionado contra a IL-12 humana e IL-23 humana ao paciente. Em ainda uma modalidade adicional, o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 100 por um período prolongado seguindo uma dose quinzenalmente, semanalmente ou dose única de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, direcionado contra a IL-12 humana e IL-23 humana ao paciente.

Em uma modalidade, a dose do anticorpo direcionada contra a IL-12 humana e/ou IL-23 humana é cerca de 200 mg ou cerca de 100 mg.

Em uma modalidade, a psoríase é uma placa psoriática, por exemplo, placa psoriática crônica. Em outra modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psoriática crônica. Em ainda outra modalidade, a psoríase é psoríase moderada a severa, por exemplo, placa psoriática moderada a severa, psoríase crônica moderada a severa ou placa psoriática crônica moderada a severa.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, é administrada através da administração subcutânea.

Em outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo os passos de: (i) selecionar um paciente que está sofrendo de psoríase crônica; e (ii) administração ao paciente de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase crônica no paciente.

Em uma modalidade, o paciente tem tido um diagnóstico clínico de psoríase por pelo menos 6 meses. Em outra modalidade, o paciente tem tido placas psoriáticas estáveis por pelo menos 2 meses.

Em ainda outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo os passos de: (i) selecionar um paciente que não tenha tido uma condição selecionada a partir do grupo consistindo de exposição prévia à terapia anti-IL-12 sistêmica ou biológica; psoríase não placa; inabilidade de descontinuar terapias psoríase tópica pelo menos 2 semanas antes do tratamento; fototerapia de luz ultravioleta B pelo menos 2 semanas antes do tratamento; fototerapia de luz ultravioleta psoralena pelo menos 4 semanas antes do tratamento; terapias sistêmicas pelo menos 4 semanas antes do tratamento; terapias biológicas pelo menos 12 semanas antes do tratamento; ingestão requerida de corticosteróides orais ou injetáveis durante o tratamento; uma exarcebação da asma requerendo hospitalização nos 10 anos anteriores à seleção; uma infecção ou fatores de risco para infecção severa; uma história de malignâncias outras que trataram com sucesso carcinoma celular basal, por exemplo, com uma história de carcinoma celular escamoso, ou um carcinoma cervical local; e uma história de reação imunológica principal, por exemplo, doença do soro ou reação anafilatóide, a um agente contendo imunoglobulina G, por exemplo, gamaglobulina intravenosa, uma proteína fusão, ou um anticorpo monoclonal; e (ii) administração ao paciente de um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase no paciente.

Em ainda outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo os passos de: (i) selecionando um paciente que não tenha tido vacinação com um agente viral vivo dentro de 1 mês; e (ii) administrando a um paciente de um anticorpo, ou porção de ligação do antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo para a subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase no paciente.

Em ainda um aspecto adicional, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo os passos de: (i) administrar um anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23 para o paciente; (ii) monitorando o paciente para um resultado laboratorial anor-

mal clinicamente significativo selecionado a partir do grupo consistindo de aspartato transaminase ou alanina transaminase >5 vezes para o limite superior normal; bilirrubina sérica total >3 vezes do limite superior normal; creatinina sérica >3 vezes do limite superior normal; creatinina fosfoquinase >5 vezes do limite superior normal; hemoglobina <8 g/dL; células brancas sanguíneas <2x10<sup>9</sup>/L; e contagem de plaqueta <75x10<sup>9</sup>/L; e (iii) administração descontinuada do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, em um paciente em que o resultado laboratorial anormal clinicamente significativo é detectado; assim tratando psoríase no paciente.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação do antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é administrado semanalmente ou em uma dose única.

Em uma modalidade o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é administrada em uma dose de cerca de 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg ou 220 mg.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é capaz de ligar ao epítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligada à subunidade p35 de IL-12. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é capaz de ligar ao apítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligada a uma subunidade p19 da IL-23. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é capaz de ligar ao epítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligado à subunidade p35 da IL-12 e quando a subunidade p40 está ligada a uma subunidade p19 da IL-23.

Em uma modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psorítica crônica, por exemplo, placa psorítica moderada a severa.

Em outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo a administração a um paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 90 por um período prolongado seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, dessa forma tratando psoríase no paciente.

Em uma modalidade, o período prolongado é pelo menos cerca de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligador de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente. Em ainda outra modalidade, o anticorpo é administrado em uma dose única.

Em uma modalidade o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é ad-

ministrado em uma dose de cerca de 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, ou 220 mg.

Em uma modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psoriática crônica, por exemplo, placa psoriática crônica moderada a severa.

5 Em ainda outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo administração a um paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23 do paciente, em que o paciente mantém uma avaliação AGM clara ou mínima por um período de tempo prolongado seguindo a administração inicial do anticorpo, ou uma porção  
10 ligadora de antígeno do mesmo, assim tratando psoríase no paciente.

Em uma modalidade, o período prolongado é pelo menos cerca de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 semanas.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente. Em ainda outra modalidade, o anticorpo é  
15 administrado em uma dose única.

Em uma modalidade o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg.

20 Em uma modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psoriática crônica, por exemplo, placa psoriática moderada a severa.

Em ainda um aspecto adicional, a invenção provê um método de tratar a psoríase em um paciente compreendendo a administrar ao paciente um anticorpo, porção ligadora do antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou  
25 IL-23 do paciente, em que o paciente exibe um PASI melhorado por cerca de 8 semanas seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim tratando a psoríase no paciente.

Em uma modalidade, o paciente exibe um índice PASI melhorado por cerca de 7 semanas, cerca de 6 semanas, cerca de 5 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 3 se-  
30 manas, cerca de 2 semanas ou cerca de 1 semana seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrada quinzenalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrada semanalmente. Em ainda outra modalidade, o anticorpo é  
35 administrado em uma dose única.

Em uma modalidade o anticorpo, ou poção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg,

160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, ou 220 mg.

Em uma modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psoriática crônica, por exemplo, placa psoriática crônica moderada a severa.

5 Em outro aspecto, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo a administração de um anticorpo ao paciente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 50 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, assim tratando a psoríase no paciente.

10 Em um aspecto relacionado, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo a administração de um anticorpo a um paciente, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 75 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim tratando a psoríase no paciente.

15 Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente compreendendo a administração de um anticorpo a um paciente, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 90 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim tratando a psoríase no paciente.

20 Em uma modalidade, o período prolongado seguindo descontinuação da administração do anticorpo é pelo menos cerca de 12 semanas.

25 Em uma modalidade, o anticorpo é administrado por pelo menos cerca de 12 semanas.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é administrado em uma dose única.

30 Em uma modalidade o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, ou 220 mg.

Em uma modalidade, a psoríase é psoríase crônica, por exemplo, placa psoriática crônica, por exemplo, placa psoriática crônica moderada a severa.

35 Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é ca-

paz de ligar ao epítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 é ligada à subunidade p35 da IL-12. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção da ligação de antígeno do mesmo, é capaz de ligar o epítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 é ligada à subunidade p19. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, é capaz de ligar o epítipo da subunidade p40 quando a subunidade p40 é ligada à subunidade p35 da IL-12 e quando a subunidade p40 é ligada a uma subunidade p19.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 ao qual um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo de ligantes Y61 e J695.

Em outra modalidade, o anticorpo é ainda capaz de ligar a um primeiro heterodímero e é também capaz de ligar a um segundo heterodímero, em que o primeiro heterodímero compreende a subunidade p40 da IL-12 e a subunidade p35 da IL-12, e em que o segundo heterodímero compreende a subunidade p40 da IL-12 e uma subunidade p19.

Em uma modalidade adicional, o anticorpo neutraliza a atividade do primeiro heterodímero. Em outra modalidade, o anticorpo neutraliza a atividade do segundo heterodímero. Em ainda outra modalidade, o anticorpo neutraliza a atividade do primeiro heterodímero e o segundo heterodímero.

Em uma modalidade adicional, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio in vitro de PHA com um IC50  $1 \times 10^{-9}$  M ou mesmo, ou que inibe a produção de IFN $\gamma$  humano com um IC50 de  $1 \times 10^{-10}$  M ou mesmo.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção dissociado a partir da subunidade p40 da IL-12 com um Kd de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menor ou uma constante de taxa Koff de  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  ou menor, como determinado por ressonância plásmom de superfície.

Em uma modalidade, o anticorpo isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção tem uma cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25 e uma cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26;

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção tem uma cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27 e uma cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utili-



zado nos métodos da invenção tem uma cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29 e uma cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção é capaz de ligar a uma interleucina compreendendo uma subunidade p40. Em uma modalidade, a interleucina compreende uma subunidade p40 e uma subunidade p35, por exemplo, a interleucina é IL-12. Em outra modalidade, a interleucina compreende uma subunidade p40 e uma subunidade p19. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, neutraliza a atividade da interleucina.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, liga-se a um epítipo da subunidade p40.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, é administrado a um paciente em uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, e um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode também compreender um agente adicional, tal como agente terapêutica, por exemplo, budenosida, fator de crescimento epidermal, corticosteróides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilato, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inibidores da lipoxigenase, mesalamina, olsalazina, balsalazida, anticorpos, inibidores do tromboxano, antagonistas do receptor da IL-1, anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\beta$ , anticorpos monoclonais anti-IL-6, fatores de crescimento, inibidores de elastase, compostos piridinilimidazol, anticorpos ou 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, e PDGF, anticorpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 ou seus ligantes, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetila, leflunomida, AINES, ibuprofeno, corticosteróides, prednisolona, inibidores da fosfodiesterase, agonistas adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inibidores da MAP quinase, inibidores da enzima conversora de IL-1 $\beta$ , inibidores da enzima conversora de TNF $\alpha$ , inibidores de sinalização da célula T, inibidores de metaloproteinase, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, receptores solúveis de citocinas, receptor solúvel de p55 TNF, receptor solúvel de p75 TNF, sIL-1RI, sIL-RII, sIL-6R, citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF- $\beta$ .

Em outra modalidade, o agente terapêutico na composição farmacêutica administrada ao paciente pode ser selecionado a partir do grupo consistindo de anticorpos anti-TNF e fragmentos de anticorpos dos mesmos, construções TNFR-Ig, inibidores TACE, inibidores PDE4, corticosteróides, budenosida, dexametasona, sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, inibidores da enzima conversora da IL-1 $\beta$ , IL-1ra, inibidores da tirosina quinase, 6-mercaptopurinas e IL-11.

Em outra modalidade, o agente terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo consistindo de corticosteróides, prednisolona, metilprednisolona, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, 4-aminopiridina, tizanidina, interferon- $\beta$ 1a, interferon- $\beta$ 1b, copolímero 1, oxigênio hiperbárico, imunoglobulina intravenoso, clabribina, anticorpos ou agonistas do TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, PDGF, anticorpos para CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 ou seus ligantes, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetila, leflunomida, AINES, ibuprofeno, corticosteróides, prednisolona, inibidores da fosfodiesterase, agonistas adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, inibidores da p38 ou MAP, inibidores da enzima conversora de IL-1 $\beta$ , inibidores da TACE, inibidores da sinalização da célula T, inibidores quina-se, inibidores da metaloproteinase, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, receptores solúveis de citocina, receptor solúvel p55 de TNF, receptor solúvel p75 de TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, sIL-13R, anti-P7s, ligante de p-selectina glicoproteína (PSGL), citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$ .

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizada nos métodos da invenção liga-se a IL-12 humana e/ou IL-23 humana e dissociada a partir IL-12 humana e/ou IL-23 humana, respectivamente, com um Kd de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos e uma taxa Koff constante de  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  ou menos, como determinada por ressonância plásmom de superfície. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia a partir da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com uma taxa koff constante de  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  ou menos. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com uma taxa koff constante de  $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  ou menos.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se a IL-12 humana e/ou IL-23 humana e dissocia-se a partir IL-12 humana e/ou IL-23 humana, respectivamente, com uma taxa Koff constante de  $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$  ou menos, como determinada por ressonância de plásmom de superfície. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia-se a partir da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com uma taxa koff constante de  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com uma taxa koff constante de  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  ou menos. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com uma taxa koff constante de  $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  ou menos.

Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se a IL-12 humana e/ou IL-23 humana e dissocia-se a partir IL-12 humana e/ou IL-23 humana, respectivamente, com um Kd constante de  $1,34 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em ainda outra

modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se à IL-12 humana e/ou IL-23 humana e dissocia-se a partir da IL-12 humana e/ou IL-23 humana, respectivamente, com um kd de  $9.74 \times 10^{-11}$  ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é um anticorpo recombinante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção é um anticorpo neutralizante, por exemplo, neutraliza a atividade da IL-12 humana e/ou IL-23 humana. Em uma modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos. Em outra modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica de fitoemaglutinina (ensaio de PHA) com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-7}$  M ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos. Em ainda uma modalidade adicional, o anticorpo neutralizante, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  com um  $IC_{50}$  de  $5 \times 10^{-12}$  M ou menos.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção

a) inibe a proliferação blástica da fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) tem uma cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25; e

c) tem uma cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26. Em uma modalidade, o anticorpo ainda tem uma cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27; e uma cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ainda tem uma cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29; e uma cadeia leve CDR1 compreendendo

do a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ainda inibe proliferação blástica com fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um OC50 de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em ainda outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ainda inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um IC50 de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção têm uma região de cadeia variável pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:31, e uma região de cadeia variável leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:32.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção compreende uma região constante de cadeia pesada selecionada a partir do grupo consistindo de regiões constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. Em uma modalidade, a região constante da cadeia pesada do anticorpo é IgG1. Em outra modalidade o anticorpo é um fragmento Fab, fragmento F(ab')<sub>2</sub>, ou um fragmento Fv de cadeia única.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção dissocia a partir da IL-12 humana e/ou IL-23 humana com um K<sub>d</sub> de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos e liga-se a um epítipo na subunidade p40 da IL-12 humana e/ou IL-23 humana.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, utilizada nos métodos da invenção é um anticorpo humano, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, que

a) dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa constante K<sub>off</sub> de  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância de plásmem de superfície;

b) tem uma cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO: 25; e

c) tem uma cadeia leve CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26.

Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa constante k<sub>off</sub> de  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  ou menos. Em uma modalidade ainda, o anticorpo humano, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa constante k<sub>off</sub> de  $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  ou menos.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção é um anticorpo humano, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que se liga a IL-12 humana e compreende:

um domínio CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26; e

um domínio CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25.

5 Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, tem uma região variável de cadeia leve (RVCL) tendo um domínio CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26, e tem uma região variável de cadeia pesada (RVCP) tendo um domínio CDR3 compreendendo a sequência aminoácida de SEQ ID NO:25. Em outra modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreende uma  
10 RVCL ainda tendo um domínio CDR2 compreendendo a sequência aminoácida de SEQ ID NO:28 e uma RVCP ainda compreendendo um domínio CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27. Em ainda outra modalidade, a RVCL ainda tem um domínio CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30 e a RVCP tem um domínio CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29.

15 Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se a IL-12 humana e/ou IL-23 humana e é o anticorpo J695 (também referido como ABT-874), ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, liga-se a IL-12 humana e/ou IL-23 humana e dissocia-se a partir da IL-12 com um  $K_d$  de  $1,34 \times 10^{-10}$  M ou menos, e neutraliza a IL-12 humana e/ou IL-23 humana. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia-se a partir da IL-12 e/ou IL-23 humana com um  $K_d$  de  $9,74 \times 10^{-11}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-7}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  humano com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em uma  
30 modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  humano com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, inibe a produção de IFN $\gamma$  humano com um  $IC_{50}$  de  
35

$1 \times 10^{-12}$  M ou menos.

Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção inibe a ligação da IL-12 e/ou IL-23 ao seu receptor em um ensaio de ligação do receptor de IL-12 ou IL-23 (RBA), respectivamente, com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção inibe a ligação da IL-12 e/ou IL-23 ao seu receptor em um ensaio de ligação do receptor de IL-12 ou IL-23 (RBA), respectivamente, com um IC50 de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos da invenção inibe a ligação da IL-12 e/ou IL-23 ao seu receptor em um ensaio de ligação do receptor de IL-12 ou IL-23 (RBA), respectivamente, com um IC50 de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra a disposição do paciente da triagem. (O termo "cos" refere-se a cada outra semana de dose).

Figure 2 mostra a porcentagem de pacientes com pelo menos 75% de melhoramento na área de psoríase e índice de severidade (PASI 75) durante a porção da 12 semana da triagem. Pela semana 8, com a exceção de 200 mg x 1 grupi, a porcentagem de pacientes que tiveram uma resposta PASI 75 foi estatisticamente significativa maior ( $p < 0,001$ ) em cada grupo de tratamento ABT-874 para cada comparação com placebo baseado em uma análise de variância dos dados observados para a população com intenção de tratamento. (O termo "cos" refere-se a cada outra semana de dose).

A Figura 3 mostra a porcentagem média de melhoramento na área da psoríase e os índices do índice de severidade (PASI) a partir da linha de base. Os dados mostram que  $*p < 0,001$  para cada grupo de tratamento ABT-874 comparado com placebo em todos os pontos (exceto 100 mg cos na semana 1,  $p = 0,023$ ) baseado na análise da variância dos dados observados para a população com intenção de tratamento (O termo "cos" refere-se a cada outra semana de dose).

A Figura 4A-C mostra a porcentagem de pacientes que mantiveram uma resposta PASI 50, PASI 75 e PASI 90, respectivamente, na semana 24 da triagem, isto é, nas 12 semanas seguindo a descontinuação da administração do anticorpo.

Figura 4D mostra a porcentagem dos pacientes mantendo a resposta PASI 75 ao longo do tempo durante o período da semana 24 da triagem.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A fim de que a presente invenção possa ser mais rapidamente entendida, certos termos são primeiro definidos.

O termo "aumentando atividade do resíduo aminoácido" inclui um resíduo aminoácido que melhora a atividade do anticorpo. Isto deve ser entendido que a atividade aumen-

tada do resíduo aminoácido pode substituir um resíduo aminoácido em um contato, hipermutação ou posição de mutagênese seletiva preferida e, ainda, que mais uma atividade aumentada do resíduo aminoácido possa estar presente dentro de um ou mais CDRs. Um resíduo aminoácido de atividade aumentada inclui um resíduo aminoácido que melhora a ligação de especificidade/afinidade de em anticorpo, por exemplo, anticorpo anti- IL-12 anti-  
5 humano de ligando a uma IL-12 humana. A atividade aumentada de um resíduo de aminoácido é também tencionada para incluir um resíduo aminoácido que melhora a potência de neutralização de um anticorpo, por exemplo, o anticorpo IL-12 humano que inibe a IL-12 humana.

10 O termo “anticorpo” inclui uma molécula de imunoglobulina compreendida de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (P) e duas cadeias leves (L) interconectadas por pontes dissulfetos. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como RVCP ou VP) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3.  
15 Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como RVCL ou VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. As regiões VP e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementariedades (CDRs), intercalado com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VP e VL é composto de três CDRs e quatro FRs, arrajandas a partir  
20 do amino-terminal para o carbóxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em uma modalidade, o anticorpo utilizado nas composições e métodos da invenção é o anticorpo descrito na Patente dos EUA No. 6.914.128, incorporada aqui por referência. Em outra modalidade, o anticorpo utilizado nas composições e métodos da invenção é o anticorpo ABT-874 (também referido como J695; Laboratórios Abbott).

O termo “porção ligadora de antígeno” de um anticorpo (ou “porção anticorpo”) inclui fragmentos de um anticorpo que retém a habilidade de especificamente se ligar a um antígeno (por exemplo, hIL-12). Tem sido mostrado que a função ligadora de antígeno de um anticorpo pode ser formada por fragmentos de um anticorpo de comprimento inteiro. Exemplos de fragmentos de ligação compreendidos dentro do termo “porção ligadora de antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo de domínios VL, VP, VL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto em uma região dobradiça; (iii) um fragemnto Fd consistindo de domínios VP e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo de domínios VL e VP de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste de um domínio VC; e (vi) uma região determinante de complementariedade (CDR) isolado. Além disso, embora os dois domínios do  
35

fragmento Fv, VL e VP, são codificados para genes separados, eles podem ser juntados, utilizando métodos recombinantes, por um ligador sintético que permite a eles serem como uma cadeia de proteína única em que as regiões VL e VP se pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidos como cadeia única Fv (scFv); ver por exemplo, Bird *et al* (1988) Science 242:423-426; e Huston *et al* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única são também tencionados serem compreendidos dentro do termo “porção ligadora de antígeno” de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia única, tais como dianticorpos são também compreendidos. Dianticorpos são bivalentes, anticorpos biespecíficos em que domínios VP e VL são expressos em uma cadeia polipeptídica única, mas utilizando um ligador que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, assim forçando os domínios para parear com os domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno (ver, por exemplo, Holliger, P. *et al* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448; Poljak, R.J. *et al* (1994) Structure 2:1121-1123). Ainda adicionalmente, um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo pode ser parte de uma molécula de imunoadesão maior, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem uso de região núcleo de estreptavidina para fazer uma molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) e uso de um resíduo cisteína, um peptídeo marcador e um marcador poliistidina C-terminal para fazer moléculas scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al* (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Porções de anticorpo, tais como fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub>, podem ser preparadas a partir de anticorpos inteiros utilizando técnicas convencionais, tais como digestão de papaína e pepsina, respectivamente, de anticorpos inteiros. Além disso, anticorpos, porções de anticorpos e moléculas imunoadesivas podem ser obtidas utilizando técnicas de DNA recombinante padrão, como aqui descrito. Porções ligadoras de antígeno preferidas são domínios completos ou pares de domínios completos.

O termo “mutação retrógrada” refere-se a um processo em que algum ou todos os aminoácidos mutados somaticamente de um anticorpo humano são substituídos com os resíduos da linha germinativa correspondente a partir de uma sequência de anticorpo linha germinativa homólogo. As sequências cadeias de pesada e leve do anticorpo humano da invenção são alinhados separadamente com as sequências linha germinativa na base de dados VBASE para identificar as sequências com a mais alta homologia. Diferenças no anticorpo humano da invenção são retornadas para a sequência linha germinativa por mutar as posições nucleotídicas definidas codificando tal aminoácido diferente. O papel de cada aminoácido então identificado como candidato para mutação retrógrada deve ser investigado para papel direto ou indireto na ligação de antígeno e qualquer aminoácido encontrado após



mutação para afetar qualquer característica desejável do anticorpo humano deve não ser incluído no anticorpo humano final; como um exemplo, atividade aumentada de aminoácidos identificados pela abordagem de mutagênese seletiva não será sujeita a mutação retrógrada. Para minimizar o número de aminoácidos sujeitos para mutação retrógrada àquelas posições aminoácidas encontradas serem diferentes a partir da sequência linha germinativa mais próxima, mas idêntica ao aminoácido correspondente em uma segunda sequência linha germinativa pode permanecer, provido que a segunda sequência linha germinativa é idêntica e colinear à sequência do anticorpo humano da invenção por pelo menos 10, preferivelmente 12 aminoácidos, em ambos os lados do aminoácido em questão. Mutação retrógrada pode ocorrer em qualquer estágio da otimização do anticorpo; preferivelmente, mutação retrógrada ocorre diretamente antes ou depois da abordagem de mutagênese seletiva. Mais preferivelmente, mutação retrógrada ocorre diretamente antes da abordagem de mutagênese seletiva.

A frase "interleucina 12 humana" (abreviada aqui como hIL-12, ou IL-12), como aqui utilizado, inclui uma citocina humana que é secretada primariamente por macrófagos e células dendríticas. O termo inclui uma proteína heterodimérica compreendendo uma subunidade de 35 kD (p35) e uma subunidade 40 kD (p40) que são ambas ligadas juntas com uma ponte dissulfeto. A proteína heterodimérica é referida como uma "subunidade p70". A estrutura da IL-12 humana é descrita ainda em, por exemplo, 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. O termo IL-12 humano é tencionado para incluir IL-12 humana recombinante (rh IL-12), que pode ser preparado por métodos de expressão recombinante padrões.

Os termos "numeração Kabat", "definições Kabat" e "marcação Kabat" são utilizados de modo passível de mudança aqui. Esses termos, que são reconhecidos na técnica, referem-se a um sistema de numeração de resíduos aminoácidos que são mais variáveis (isto é, hipervariável) que outros resíduos aminoácidos nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo, ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo (Kabat *et al* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391) e Kabat, E. A. *et al* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Edição, Departamento dos EUA de Serviços de Saúde e Humano, Publicação NIH No. 91-3242). Para a região variável de cadeia pesada, a região hipervariável varia de posições aminoácidas 31 a 35 para CDR1, posições aminoácidas 50 a 65 para CDR2, e posições aminoácidas 95 a 102 para CDR3. Para a região variável de cadeia leve, a região hipervariável varia de posições aminoácidas 24 a 34 para CDR1, posições aminoácidas 50 a 56 para CDR2, e posições aminoácidas 89 a 97 para CDR3.

A numeração Kabat é utilizada aqui para indicar as posições de modificações aminoácidas feitas em anticorpos da invenção. Por exemplo, o anticorpo Y61 anti-IL-12 pode

ser mutado de serina (S) para ácido glutâmico (E) na posição 31 da cadeia pesada CDR1 (H31S → E), ou glicina (G) pode ser mutada para tirosina (Y) na posição 94 da cadeia leve CDR3 (L94G → Y).

O termo “anticorpo humano” inclui anticorpos tendo regiões variável e constante correspondendo a sequências de imunoglobulina linha germinativa humanas como descrito por Kabat *et al* (Ver Kabat *et al* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento dos EUA de Serviços em Saúde e Humanos, Publicação NIH No. 91-3242). Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulinas linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio específico *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nos CDRs e em particular CDR3. As mutações preferivelmente são introduzidas utilizando a “abordagem de mutagênese seletiva” descrita aqui. O anticorpo humano pode ter pelo menos uma posição substituída com um resíduo aminoácido, por exemplo, uma atividade aumentada do resíduo aminoácido que não é codificado por sequênci imunoglobulina linha germinativa humana. O anticorpo humano pode ter até vinte posições substituídas com resíduos aminoácidos que não são parte da sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em outras modalidades, até dez, até cinco, até três ou até duas posições são substituídas. Em uma modalidade preferida, essas substituições estão dentro das regiões CDR como descrito em detalhes abaixo. Entretanto, o termo “anticorpo humano”, como aqui utilizado, não é tencionado incluir anticorpos em que as sequências CDR derivadas a partir da linha germinativa de outras espécies mamíferas, tal como camundongo, têm sido enxertada em sequências estruturais humanas.

A frase “anticorpo humano recombinante” inclui anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos expressos utilizando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira (descrita adicionalmente na Seção II abaixo), anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante combinatorial (descrito adicionalmente na Seção III, abaixo), anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes da imunoglobulina humana (ver, por exemplo, Taylor, L.D., *et al* (1992) Nucl. Acids. Res. 20:6287-6295) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por quaisquer outros meios que envolvem junção das sequências gênicas imunoglobulinas humanas para outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas a partir das sequências de imunoglobulina linha germinativa humana (Ver Kabat, E.A. *et al* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento dos EUA de Serviços de Saúde e Humano, Publicação NIH No. 91-3242). Em certas modalidades, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes são sujeitos para mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para

sequências Ig humanas é utilizado, mutagênese somática in vivo) e então as sequências aminoácidas das regiões VP e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que, enquanto derivadas a partir de e relacionadas a sequências VP e VL linha germinativa humana. Em certas modalidades, entretanto, tais anticorpos recombinantes são o resultado da  
5 abordagem de mutagênese seletiva ou mutação retrógrada ou ambos.

Um “anticorpo isolado” inclui um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se liga a hIL-12 é substancialmente livre de anticorpos que especificamente se ligam a antígenos outros que hIL-12). Um anticorpo isolado que especificamente  
10 se liga a hIL-12 pode ser ligar moléculas IL-12 a partir de outras espécies (discutidos em adicionais detalhes abaixo). Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material e/ou químico.

Um “anticorpo neutralizante” (ou um “anticorpo que neutralizou a atividade da hIL-12”) inclui um anticorpo que se ligou a hIL-12 e resultou na inibição da atividade biológica da  
15 hIL-12. Esta inibição da atividade biológica da hIL-12 podem ser avaliada por medir um ou mais indicadores da atividade biológica da hIL-12, tal como inibição da proliferação blástica da fitoemaglutinina humana em um ensaio de proliferação blástica por fitoemaglutinina (PHA), ou inibição da ligação ao receptor em um ensaio de ligação ao receptor de IL-12 humana (ver Exemplo 3 – Ensaio de Indução de Interferon Gama da Patente dos EUA No.  
20 6.914.128). Esses indicadores da atividade biológica hIL-12 pode ser avaliada por um ou mais de vários ensaios in vitro e in vivo padrões conhecidos na técnica (ver Exemplo 3 da Patente dos EUA 6.914.128).

O termo “atividade” inclui atividades tais como a especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno, por exemplo, um anticorpo anti-hIL-12 que se liga a um  
25 antígeno IL-12 e/ou a potência neutralizante de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo anti-hIL-12 que se liga a hIL-12 e inibe a atividade biológica da hIL-12, por exemplo, inibição de uma proliferação blástica por PHA ou inibição da ligação ao receptor em um ensaio de ligação ao receptor de IL-12 humana (ver Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128).

A frase “ressonância de plásmon de superfície” inclui um fenômeno óptico que permite para a análise de interações bioespecíficas em tempo real por detecção de alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz biosensora, por exemplo, utilizando o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ). Para descrições adicionais, ver Exemplo 5 da Patente dos EUA No. 6.914.128 e Jonsson, U. *et al* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U. *et al* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., *et al* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; e Johnson, B., *et al* (1991) *Anal. Biochem.*  
35 198:268-277.

O termo “koff”, como aqui utilizado, é tencionado para referir-se à taxa constante off

para dissociação de um anticorpo a partir do complexo anticorpo/antígeno.

O termo "kd", como aqui utilizado, é tencionado para referir-se à constante de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

A frase "molécula de ácido nucléico" inclui moléculas de DNA e moléculas de RNA.

5 Uma molécula de ácido nucléico pode ser uma fita simples ou fita dupla, mas preferivelmente é DNA de fita dupla.

A frase "molécula isolada de ácido nucléico", como utilizada aqui em referência aos ácidos nucléicos codificando anticorpos ou porções de anticorpos (por exemplo, VP, VL, CDR3) que se ligam a hIL-12 incluindo "anticorpos isolados"), incluem uma molécula de  
10 ácido nucléico em que as sequências nucleotídicas codificando o anticorpo ou porção anticorpo são livres de outras sequências nucleotídicas codificando anticorpos ou porções de anticorpo que se ligam a antígenos outros que hIL-12, que outras sequências podem naturalmente ladeia o ácido nucléico no DNA genômico humano. Então, por exemplo, um ácido nucléico isolado da invenção codificando uma região VP de um anticorpo anti-IL-12 não contém outras sequências codificando outras regiões VP que se liguem aos antígenos outros que IL-12. A frase "molécula aminoácida isolada" é também tencionada incluir sequências codificando anticorpos bivalentes, biespecíficos, tais como dianticorpos em que as regiões VP e VL não contêm outras sequências que as sequências do dianticorpo.

O termo "vetor" inclui uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro  
20 ácido nucléico ao qual ele tenha sido ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos episomais). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não episomais) podem ser integrados no genoma da célula hospedeira sob introdução na célula hospedeira, e assim são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operativamente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão"). Em geral, vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinantes são sempre na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser utilizados de modo passível de mudança como o plasmídeo é mais comumente forma de vetor. Entretanto, a invenção é tencionada a incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como  
30 vetores virais (por exemplo, replicação defeituosa de retrovírus, adenovírus e vírus associados a adeno), que serve funções equivalentes.

A frase "células hospedeiras recombinantes" (ou simplesmente "célula hospedeira")

inclui uma célula em que um vetor de expressão recombinante tem sido introduzido. Deve ser entendido que tais termos são tencionados referir-se não somente à célula particular sujeita, mas para a progênie de tal célula. Por causa de certas modificações podem ocorrer em gerações sucessoras devido a ou mutação ou influências ambientais, tal progênie pode não, de fato, ser idêntico a célula parental, mas são ainda incluídas dentro do objetivo do termo “célula hospedeira” como aqui utilizado.

O termo “modificar”, como aqui utilizado, é tencionado referir-se a mudar um ou mais aminoácidos nos anticorpos ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos. A mudança pode ser produzida por adição, substituição ou deleção de um aminoácido em uma ou mais posições. A mudança pode ser produzida utilizando técnicas conhecidas, tal como mutagênese PCR.

A frase “posição de contato” inclui uma posição aminoácida do CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia leve de um anticorpo que é ocupada por um aminoácido que tem contato com antígeno em uma das vinte e seis estruturas anticorpo-antígeno. Se um aminoácido CDR em qualquer dos 26 estruturas solvidas conhecidas de complexos anticorpo-antígeno contacta o antígeno, então que aminoácido pode ser considerado para ocupar uma posição de contato. Posições de contato têm uma probabilidade mais alta de ser ocupadas por um aminoácido cujo antígeno de contato que posições não contato. Preferivelmente uma posição de contato é uma posição CDR que contém um aminoácido que contém antígeno em maiores que 3 a 26 estruturas (>11,5%). Mais preferivelmente uma posição de contato é uma posição de CDR que contém um aminoácido que contanto antígeno é maior que 8 a 25 estruturas (>32%).

O termo “posição hipermutação” inclui um resíduo aminoácido que ocupa a posição na região CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia leve de um anticorpo que é considerado ter uma frequência ou probabilidade para hipermutação somática durante maturação de afinidade *in vivo* do anticorpo. “Alta frequência ou probabilidade para hipermutação somática” inclui frequências ou probabilidades de 5 a cerca de 40% de chance que o resíduo passará por hipermutação somática durante a maturação de afinidade *in vivo* do anticorpo. Deve ser entendido que todas as variações dentro deste estado de variação são também tencionam ser parte desta invenção, por exemplo, 5 a cerca de 30%, por exemplo, 5 a cerca de 15%, por exemplo, 15 a cerca de 30%.

O termo “posição de mutagênese seletiva preferida” inclui um resíduo aminoácido que ocupa uma posição na região CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada ou região variável de cadeia leve que pode ser considerada para ambos, uma posição de contato e uma hipermutação.

A frase “abordagem de mutagênese seletiva” inclui um método de melhorar a atividade de um anticorpo por selecionar e individualmente mutar aminoácidos CDR em pelo

menos uma posição de mutagênese seletiva preferida, hipermutação, e/ou posição de contato. Um anticorpo humano “seletivamente mutado” é um anticorpo que contém uma mutação em uma posição selecionada utilizando uma abordagem de mutagênese seletiva. Em outra modalidade, a abordagem de mutagênese seletiva é tencionada prover um método de preferivelmente mutar resíduos aminoácidos individualmente selecionados em CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada (de agora em diante P1, P2, e P3, respectivamente), ou o CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia leve (de agora em diante referido como L1, L2, e L3, respectivamente) de um anticorpo. Resíduos aminoácidos podem ser selecionados a partir de posições de mutagênese seletivas, posições de contato, ou posições de hipermutação. Resíduos aminoácidos podem ser selecionados a partir de posições de mutagênese seletivas preferidas, posições de contato, ou posições de hipermutação. Aminoácidos individuais são selecionados baseados na sua posição na região variável de cadeia leve ou pesados. Deve ser entendido que uma posição de hipermutação pode também ser uma posição de contato. Em uma modalidade, a abordagem de mutagênese seletiva é uma “abordagem com alvo”. A linguagem “abordagem em alvo” é tencionada incluir um método de preferivelmente mutar resíduos aminoácidos individuais selecionados em CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada ou CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia leve de um anticorpo em uma maneira alvo, por exemplo, “abordagem em alvo grupo-guia” ou “abordagem em alvo CDR-guia”. Na “abordagem em alvo grupo-guia”, resíduos aminoácidos individuais em particular grupos são alvos para mutações seletivas incluindo grupos (incluindo L3 e P3), II (incluindo P2 e L1) e III (incluindo L2 e P1), os grupos sendo listados a fim de preferência por alvos. Na “abordagem em alvo CDR-guia”, resíduos aminoácidos individuais em particular CDRs são alvos para mutações seletivas com a ordem de preferência para alvos como segue: P3, L3, P2, L1, P1 e L2. Os resíduos aminoácidos selecionados são mutados, por exemplo, para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos, e o efeito da mutação na atividade do anticorpo é determinado. Atividade é medida como uma mudança na especificidade/afinidade de ligação do anticorpo, e/ou potências de neutralização do anticorpo. Deve ser entendido que a abordagem de mutagênese seletiva pode ser utilizada para a otimização de qualquer anticorpo derivado a partir de qualquer fonte incluindo revelação fago, animais transgênicos com genes linha germinativa de IgG humana, anticorpos humanos isolados a partir de célula B. Preferivelmente, a abordagem de mutagênese seletiva é utilizada em anticorpos que não podem ser otimizados ainda utilizando tecnologia de revelação de fago. Deve ser entendido que anticorpos a partir de qualquer fonte incluindo revelação fago, animais transgênicos com genes linha germinativa IgG humana, anticorpos humanos isolados a partir de células B humana podem ser sujeitos a mutação retrógrada antes ou após da abordagem de mutagênese seletiva.

O termo “atividade aumentada do resíduo aminoácido” inclui um resíduo aminoáci-

do que melhora a atividade do anticorpo. Deve ser entendido que a atividade aumentada do resíduo aminoácido pode substituir um resíduo aminoácido em uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato, ou uma posição de hipermutação e, ainda, mais que uma atividade aumentada do resíduo aminoácido pode estar presente dentro de um ou mais CDRs. Uma atividade aumentada do resíduo aminoácido inclui, um resíduo aminoácido que melhora a especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo, por exemplo, anticorpo anti-IL-12 humano se ligando a IL-12 humana. A atividade aumentada do resíduo aminoácido é também tencionada incluir um resíduo aminoácido que melhora a potência de neutralização de um anticorpo, por exemplo, o anticorpo IL-12 humano que inibe a IL-12 humana.

10 O termo “dose”, como aqui utilizado, refere-se à administração de uma substância (por exemplo, um anticorpo anti-IL-12, anti-IL-23) para alcançar um objetivo terapêutico (por exemplo, o tratamento de artrite reumatóide).

Os termos “regime de dose quinzenalmente”, “dose quinzenalmente”, e “administração quinzenalmente”, como aqui utilizado, refere-se ao tempo de curso de administração de uma substância (por exemplo, um anticorpo anti-IL-12, anti-IL-23) a um paciente para alcançar um objetivo terapêutico, em que o tempo de curso é cada outra semana (cos). O regime de dose quinzenalmente não tenciona incluir um regime de dose semanal. Preferivelmente, a substância é administrada cada 9-19 dias, mais preferivelmente, cada 11-17 dias, ainda mais preferivelmente, cada 13-15 dias, e mais preferivelmente, cada 14 dias.

20 O termo “combinação” como na frase “um primeiro agente em combinação com um segundo agente” inclui co-administração de um primeiro agente e um segundo agente, que, por exemplo, pode ser dissolvido ou intermisturado no mesmo veículo farmacologicamente aceitável, ou administração de um primeiro agente seguido pelo segundo agente, ou administração do segundo agente, seguido pelo primeiro agente. A presente invenção, assim, inclui métodos de combinação de tratamento terapêutico e combinação de composições farmacêuticas.

O termo “concomitante” como na frase “tratamento terapêutico concomitante” inclui administração de um agente em presença de um segundo agente. Um método de tratamento terapêutico como agente está em presença de um segundo agente. Um método de tratamento terapêutico concomitante inclui métodos em que o primeiro, segundo, terceiro ou agentes adicionais são co-administrados. Um tratamento terapêutico concomitante também inclui métodos em que os primeiros a agentes adicionais são administrados em presença de um segundo ou agentes adicionais, em que o segundo ou agentes adicionais, por exemplo, podem ter sido previamente administrados. Um método de tratamento terapêutico concomitante pode ser executado gradativamente por componentes diferentes. Por exemplo, um componente pode administrar a um paciente um primeiro agente e um segundo componente pode administrar ao paciente a um segundo agente, e os passos de administração podem

ser executados ao mesmo tempo, ou perto do mesmo tempo, ou em tempos distantes, a fim de que o primeiro agente (e agentes adicionais) está após administração em presença do segundo agente (e agentes adicionais). O componente e o paciente podem ser a mesma entidade (por exemplo, humano).

5 O termo “combinação de terapia”, como aqui utilizado, refere-se à administração de duas ou mais substâncias terapêuticas, por exemplo, um anticorpo anti-IL-12, anti-IL-23 e outra droga. A(s) outra(s) droga(s) pode ser administrada concomitantemente com, antes de, ou seguindo a administração de um anticorpo anti-IL-12, anti-IL-23.

10 O termo “estojo” como aqui utilizado refere-se a um pacote de produto compreendendo componentes com os quais se administra o anticorpo anti-IL-12, anti-IL23 da invenção para tratamento de um distúrbio relacionado a IL-12. O estojo preferivelmente compreende uma caixa ou recipiente que engloba os componentes do estojo. A caixa ou recipiente é afixada com uma etiqueta ou um protocolo aprovado da “Food and Drug Administration”. A caixa ou recipiente engloba componentes da invenção que são preferivelmente contidos dentro de recipientes de plástico, polietileno, polipropileno, etileno, ou propileno. Os recipientes podem ser tubos ou garradas com tampa. O estojo pode também incluir instruções para administração de um anticorpo anti-IL-12, anti-IL-23.

Vários aspectos da invenção são descritos em detalhes adicionais nas seguintes subseções.

20 I. Anticorpos Humanos que se Ligam a IL-12 Humana

Este invenção provê métodos e composições para uso de anticorpos humanos, ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, que se ligam a IL-12 humana para o tratamento de psoríase. A invenção também inclui métodos e composições para uso de um anticorpo que se liga a IL-12 e IL-23. Preferivelmente, os anticorpos humanos utilizados na invenção são anticorpos anti-hIL-12 humano recombinante, neutralizante.

Em uma modalidade, o anticorpo utilizando na invenção é o anticorpo ABT-874 (ver Patente dos EUA No. 6.914.128). ABT-874 é um anticorpo completamente humano contra a interleucina 12 (IL-12) e IL-23. Ele se liga com uma ótima afinidade à subunidade p40 comum a ambas IL-12 e IL-23, alvos validados no tratamento da psoríase (Ps).

30 Anticorpos que ligam à IL-12 humana podem ser selecionados, por exemplo, por seleção em uma ou mais bibliotecas de cDNA VL e VP com hIL-12, tal como por técnicas de revelação fago como descrito no Exemplo I da Patente dos EUA No. 6.914.128. Seleção de bibliotecas de cDNA VL e VP humano inicialmente identificou uma série de anticorpos anti-IL-12 dos quais um anticorpo, referido aqui como “Joe 9” (ou “Joe 9 selvagem”), foi selecionado para desenvolvimento adicional. Joe 9 tem uma afinidade relativamente baixa para anticorpo IL-12 humano (por exemplo, um  $K_{off}$  de cerca de  $0,1 \text{ seg}^{-1}$ ), ainda é útil para especificamente se ligar e detectar hIL-12. A afinidade do anticorpo Joe 9 foi melhorada por



conduzir mutagênese de CDRs de cadeia leve e pesada, produzindo um painel de regiões variáveis de cadeia leve e pesada que foram “misturadas e unidas” e mutadas adicionalmente, levando a numerosos anticorpos anti-IL-12 adicionais com afinidade aumentada para hIL-12 (ver Exemplo 1, tabela 2 (ver Apêndice A) da Patente dos EUA No. 6.914.128 e os alinhamentos de sequência de Figuras 1A-D da Patente dos EUA No. 6.914.128.

Desses anticorpos, o anticorpo anti-hIL-12 humano referido aqui como Y61 demonstrou uma melhora significativa na afinidade de ligação (por exemplo, um Koff de cerca de  $2 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ ). O anticorpo Y61 anti-hIL-12 foi selecionado para maturação de afinidade adicional por resíduos aminoácidos específicos de mutação individual dentro de CDRs de cadeia pesada e leve. Resíduos aminoácidos de Y61 foram selecionados para mutação sítio-específica (abordagem de mutagênese seletiva) baseados no resíduo aminoácido ocupando uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato e/ou hipermutação. Um resumo das substituições nas posições selecionadas nos CDRs de cadeia de pesada e leve é mostrado nas Figuras 2A-2H da Patente dos EUA No. 6.914.128. Um anticorpo neutralizante recombinante preferido da invenção, referido aqui como J695 (também referido como ABT-874 (Laboratórios Abbott), resultou a partir de uma substituição Gly ou Tyr na posição 50 da cadeia leve de CDR2 do Y61, e substituição Gly ou Tyr na posição 94 da cadeia leve de CDR3 do Y61.

Alinhamentos da sequência de aminoácidos de regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um painel de anticorpos anti-IL-12 utilizado na invenção, na linhagem a partir de Joe 9 selvagem para J695, são mostrados nas Figuras 1A-1D da Patente dos EUA No. 6.914.128. Essa sequência de alinhamentos permitiu a identificação de consenso de sequências para regiões variáveis de cadeia pesada e leve preferidas de anticorpos da invenção que se ligam a hIL-12, bem como como consenso de sequências para CDR3, CDR2 e CDR1, na linhagem a partir de Joe 9 para J695. Além disso, a análise de mutagênese Y61 resumida nas Figuras 2A-2H permitiu a identificação das sequências consenso para regiões variáveis de cadeia pesada e leve que se ligam a hIL-12, bem como sequências consenso para CDR3, CDR2, e CDR1 que se ligam a hIL-12 na linhagem a partir de Y61 a J695 que compreende sequências com modificações a partir de Y61 ainda retém boas características de ligação a hIL-12. Sequências CDR, VP e VL preferidas da invenção (incluindo sequências consenso) como identificado pelos identificadores de sequência na Listagem de Sequência anexada, são resumidos abaixo.

SEQ ID NO:	Cadeia de Anti-corpo	Região	Sequência
1	Consenso Joe 9 para J695	CDR H3	(H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y)

2	Consenso Joe 9 para J695	CDR L3	Q- (S/T) - Y- (D/E) - (S/R/K) - (S/G/Y) - (L/F/T/S) - (R/S/T/W/H) - (G/P) - (S/T/A/L) - (R/S/M/T/L) - (V/I/T/M/L)
3	Consenso Joe 9 para J695	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S- V-K-G
4	Consenso Joe 9 para J695	CDR L2	(G/Y) - N- (D/S) - (Q/N) - R-P-S
5	Consenso Joe 9 para J695	CDR H1	F-T-F-S- (S/E) - Y-G-M-H
6	Consenso Joe 9 para J695	CDR L1	(S/T) - G- (G/S) - (R/S) - S-N-I- (G/V) - (S/A) - (N/G/Y) - (T/D) - V- (K/H)
7	Consenso Joe 9 para J695	VH	Sequência VP inteira, ver listagem de sequência
8	Consenso Joe 9 para J695	VL	Sequência VL inteira, ver listagem de sequência
9	Consenso Y61 para J695	CDR H3	H- (G/V/C/H) - (S/T) - (H/T/V/R/I) - (D/S) - (N/K/A/T/S/F/W/H)
10	Consenso Y61 para J695	CDR L3	Q-S-Y- (D/S) - (Xaa) - (G/D/Q/L/F/R/H/N/Y) - T-H-P-A- L-L
11	Consenso Y61 para J695	CDR H2	(F/T/Y) - I- (R/A) - Y- (D/S/E/A) - (G/R) - S- (Xaa) - K- (Y/E) - Y-A-D- S-V-K-G
12	Consenso Y61 para J695	CDR L2	(G/Y/S/T/N/Q) - N-D-Q-R-P-S
13	Consenso Y61 para J695	CDR H1	F-T-F- (Xaa) - (Xaa) - (Y/H) - (G/M/A/N/S) - M-H
14	Consenso Y61 para J695	CDR L1	S-G-G-R-S-N-I-G- (S/C/R/N/D/T) - (N/M/I) - (T/Y/D/H/K/P) - V-K
15	Consenso Y61 para J695	VH	Sequência VP inteira, ver listagem de sequência
16	Consenso Y61 para J695	VL	Sequência VL inteira, ver listagem de sequência
17	Y61	CDR H3	H-G-S-H-D-N

18	Y61	CDR L3	<b>Q-S-Y-D-R-G-T-H-P-A-L-L</b>
19	Y61	CDR H2	<b>F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-</b> <b>V-K-G</b>
20	Y61	CDR L2	<b>G-N-D-Q-R-P-S</b>
21	Y61	CDR H1	<b>F-T-F-S-S-Y-G-M-H</b>
22	Y61	CDR L1	<b>S-G-G-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K</b>
23	Y61	VH	Sequência VP inteira, ver listagem de sequência
24	Y61	VL	Sequência VL inteira, ver listagem de sequência
25	J695	CDR H3	<b>H-G-S-H-D-N</b>
26	J695	CDR L3	<b>Q-S-Y-D-R-Y-T-H-P-A-L-L</b>
27	J695	CDR H2	<b>F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-</b> <b>V-K-G</b>
28	J695	CDR L2	<b>Y-N-D-Q-R-P-S</b>
29	J695	CDR H1	<b>F-T-F-S-S-Y-G-M-H</b>
30	J695	CDR L1	<b>S-G-S-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K</b>
31	J695	VH	Sequência VP inteira, ver listagem de sequência
32	J695	VL	Sequência VL inteira, ver listagem de sequência

Anticorpos produzidos a partir da afinidade de maturação do Joe 9 selvagem foram funcionalmente caracterizados por análise de ressonância plásmon de superfície para determinar a taxa de  $K_d$  e  $K_{off}$ . Uma série de anticorpos foram produzidos tendo a taxa  $K_{off}$  dentro da variação de cerca de  $0,1 \text{ s}^{-1}$  a cerca de  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , e mais preferivelmente um  $k_{off}$  de cerca de  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ou menos. Anticorpos foram também caracterizados *in vitro* para sua habilidade em inibir proliferação blástica por fitoemaglutinina (PHA), com descrito no Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128. Uma série de anticorpos foram produzidos tendo um valor de  $IC_{50}$  na variação de cerca de  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  para cerca de  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ , mais preferivelmente cerca de  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  a  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$  ou menos.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção provê métodos e composições para uso de um anticorpo humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que se liga a uma IL-12 humana e dissocia-se a partir da IL-12 humana com uma taxa constante de  $K_{off}$  de  $0,1 \text{ s}^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância plásmon de superfície, ou que inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de proliferação blástica de fitoemaglutinina *in vitro* (ensaio de PHA) com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  ou menos. Em modalidades preferidas, o anticorpo IL-12 humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissociado a partir da IL-12 humana com uma taxa constante  $K_{off}$  de  $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ou menos, ou inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  ou menos. Em mais modalidades preferidas, o anticorpo IL-12 humano isolado, ou

porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa constante  $k_{off}$  de  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  ou menos, ou inibe proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos. Em mais modalidades preferidas, o anticorpo IL-12 humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia-se a partir da IL-12 humana com uma taxa constante de  $k_{off}$  de  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  ou menos, ou inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos. Em mais modalidades preferidas, o anticorpo IL-12 humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia-se a partir da IL-12 humana com uma taxa constante de  $k_{off}$  de  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  ou menos, ou inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos. Em ainda mais modalidades preferidas, o anticorpo IL-12 humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dissocia-se a partir da IL-12 humana com uma taxa constante de  $k_{off}$  de  $1 \times 10^{-5} s^{-1}$  ou menos, ou inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um  $IC_{50}$  de  $1 \times 10^{-11}$  M ou menos.

A taxa constante de dissociação ( $k_{off}$ ) de um anticorpo IL-12 pode ser determinado por ressonância plásmom de superfície (ver Exemplo 5 da Patente dos EUA 6.914.128). Geralmente, análise de ressonância plásmom de superfície mede uma interação de ligação em tempo real entre ligante (IL-12 humana recombinante imobilizada em uma matriz biosensora) e analito (anticorpos em solução) por ressonância plásmom de superfície (RPS) utilizando um sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Análises plásmom de superfície podem também ser feitas por imobilização do analito (anticorpos em uma matriz biosensora) e presença do ligante (IL-12 recombinante em solução). Atividade de neutralização dos anticorpos de IL-12, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem ser avaliadas utilizando um ou mais dos vários ensaios *in vitro* adequados (ver Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128).

É bem conhecido na técnica que CDRs de cadeia leve e pesada de anticorpos desempenham um papel importante na especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno. Conseqüentemente, a invenção compreende anticorpos humanos tendo CDRs de cadeia leve e pesada do Joe 9, bem como outros anticorpos tendo CDRs que têm sido modificados para melhorar a especificidade/afinidade de ligação do anticorpo. Como demonstrado no Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128, uma série de modificações dos CDRs de cadeia leve e pesada resulta na maturação da afinidade dos anticorpos anti-hIL-12 humanos. Os alinhamentos da sequência aminoácida da região variável de cadeia pesada e leve de uma série de anticorpos humanos variando do tipo Joe 9 selvagem a J695 que se liga a IL-12 humana é mostrado nas Figuras 1A-1D da Patente dos EUA No. 6.914.128. Motivos da sequência consenso dos CDRs de anticorpos podem ser determinados a partir da sequência alinhamento. Por exemplo, um motivo consenso para o VP CDR3

da linhagem a partir de Joe 9 a J695 compreende a sequência aminoácida: (H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y) (SEQ ID NO:1), que compreende aminoácidos a partir da posição 95 a 102 do HCVR consenso mostrado na SEQ ID NO:7. Um motivo consenso para VL CDR3 compreende a sequência aminoácida: Q-(S/T)-Y-(D/E)-(S/R/K)-(S/G/Y)-(L/F/T/S)-(R/S/T/W/H)-(G/P)-  
 5 (S/T/A/L)-(R/S/M/T/L-V/I/T/M/L) (SEQ ID NO:2), que compreende aminoácidos a partir da posição 89 a 97 do LCVR consenso mostrado na SEQ ID NO:8.

Consequentemente, em outro aspecto, a invenção provê métodos e composições compreendendo um anticorpo humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que tem as seguintes características:

- 10 a) inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um IC<sub>50</sub> de  $1 \times 10^{-6}$  M ou menos;
- b) tem uma cadeia pesada CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:1; e
- 15 c) tem um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:2.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo ainda compreende uma VP CDR2 compreendendo a sequência aminoácida: F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:3) (que compreende aminoácidos a partir da posição 50 a 65 da HCVR consenso compreendendo a sequência aminoácida SEQ ID NO:7) e ainda compreende uma VL CDR2 compreendendo a sequência aminoácida: (G/Y)-N-(D/S)-(Q/N)-R-P-S (SEQ ID NO:4) (que compreende aminoácidos a partir da posição 50 a 56 da LCVR consenso compreendendo a sequência aminoácida SEQ ID NO:8).

Em outra modalidade preferida, o anticorpo ainda compreende uma VP CDR1 compreendendo a sequência aminoácida: F-T-F-S-(S/E)-Y-G-M-H (SEQ ID NO:5) (que compreende aminoácidos a partir da posição 27 a 35 da HCVR consenso compreendendo a sequência aminoácida SEQ ID NO:7) e ainda compreende uma VL CDR1 compreendendo a sequência aminoácida: (S/T)-G-(G/S)-(R/S)-S-N-I-(G/V)-(S/A)-(N/G/Y)-(T/D)-V-(K/H) (SEQ ID NO:6) (que compreende aminoácidos a partir da posição 24 a 34 da LCVR consenso compreendendo a sequência aminoácida SEQ ID NO:8).

30 Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo utilizando na invenção compreende um HCVR compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:7 e um LCVR compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:8.

Motivos consenso adicionais podem ser determinados baseados na análise mutacional feita em Y61 que leva ao anticorpo J695 (resumido nas Figuras 2A-2H da Patete dos  
 35 EUA No. 6.914.128). Como demonstrado pelos gráficos mostrados nas Figuras 2A-2H da Patente dos EUA No. 6.914.128, certos resíduos de CDRs de cadeia pesada e leve da Y61 foram fáceis de substituição sem impedimento significativo das propriedades de ligação da

hIL-12 do anticorpo. Por exemplo, substituições individuais na posição 30 em CDR H1 com doze resíduos aminoácidos diferentes não reduzem significativamente a taxa de Koff do anticorpo, indicando que a posição é fácil para substituição com uma variedade de resíduos aminoácidos diferentes. Então, baseado na análise mutacional (isto é, posições dentro de Y61 que foram fáceis para substituição por outros resíduos aminoácidos) motivos consenso foram determinados. Os motivos consenso para CDR3s de cadeia pesada e leve são mostrados na SEQ ID NOs:9 e 10, respectivamente, motivos consenso para CDR2s de cadeia pesada e leve são mostrados na SEQ ID NOs:11 e 12, respectivamente, e motivos consenso para CDR1s de cadeia pesada e leve são mostrados nas SEQ ID NOs: 12 e 14, respectivamente. Motivos consenso para regiões VP e VL são mostrados nas SEQ ID NOs: 15 e 16, respectivamente.

Consequentemente, em um aspecto, a invenção inclui um anticorpo humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que tem as seguintes características:

a) inibe proliferação blástica de fitoemaglutinina em um ensaio de Pha in vitro com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) tem um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:9; e

c) tem um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:10.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo ainda compreende uma VP CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:11 e ainda compreende um VL CDR2 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:12.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo ainda compreende a VP CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:13 e ainda compreende uma VL CDR1 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:14.

Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo utilizado na invenção compreende um HCVR compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:15 e um LCVR compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:16.

Um anticorpo preferido utilizado na invenção, anticorpo anti-IL-12 humano Y61, pode ser produzido por maturação de afinidade do Joe 9 selvagem por mutagenese em PCR do CDR3 (como descrito no Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128). Y61 teve uma especificidade/afinidade de ligação determinada pela ressonância plásmom de superfície e por ensaios de neutralização in vitro. Os CDR3s de cadeia pesada e leve do Y61 são mostrados na SEQ ID NOs: 17 e 18, respectivamente, as cadeias CDR2 pesada e leve de Y61 são mostradas nas SEQ ID NOs: 19 e 20, respectivamente. A VP de Y61 tem a sequência aminoácida da SEQ ID NO:23 e a VL de Y61 tem a sequência aminoácida da SEQ ID NO:24 (essas sequências são também mostradas nas Figuras 1A-1D da Patente dos EUA No. 6.914.128,

alinhadas com Joe 9).

Conseqüentemente, em outro aspecto, as características da invenção usam um anticorpo humano isolado, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que

5 a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) tem um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:17; e

c) tem um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:18.

10 Em uma modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos e composições da invenção tem um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:19 e um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:20.

15 Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos e composições da invenção tem um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:21 e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:22.

20 Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos e composições da invenção compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:23, e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:24.

25 Em certas modalidades, o comprimento inteiro do anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, tais como regiões constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, e qualquer variante alotípica aqui como descrito em Kabat (Kabat, E. A., *et al* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH No. 91-3242). Preferivelmente, a região constante de cadeia pesada do anticorpo é uma região constante de cadeia pesada IgG1. Alternativamente, a porção do anticorpo pode ser um fragmento Fab, um fragmento F(ab'2) ou um fragmento Fv de cadeia única.

30 Modificações de resíduos individuais de Y61 leve à produção de um painel de anticorpos mostrados nas Figuras 2A-2H da Patente dos EUA No. 6.914.128. A especificidade/afinidade de ligação de cada anticorpo foi determinada por ressonância plásmica de superfície e/ou por ensaios de neutralização *in vitro*.

35 Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção retrata um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que

a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro*

com um  $lc_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) tem um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO:404-SEQ ID NO:469; e

c) tem um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO:534-SEQ ID NO:579.

Em modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado nos métodos e composições da invenção tem uma cadeia pesada CDR2 compreendendo a sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO:335-SEQ ID NO:403; e uma cadeia leve CDR2 compreendendo a sequência aminoácida selecionada do grupo consistindo do grupo de SEQ ID NO:506-SEQ ID NO:533.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora do mesmo, tem uma cadeia pesada CDR1 compreendendo a sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO:288-SEQ ID NO:334; e uma cadeia leve CDR1 compreendendo a sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO:470-SEQ ID NO:505.

Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:23, e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:24.

Em certas modalidades, o comprimento inteiro do anticorpo compreendendo uma região constante de cadeia pesada tais como regiões constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE e qualquer variante alotípica aqui como descrito em Kabat (Kabat, E.A. *et al* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH No. 92-3242). Preferivelmente, a região constante da cadeia pesada no anticorpo é uma região constante de cadeia pesada de IgG1. Alternativamente, a porção de anticorpo pode ser um fragmento Fab, um fragmento F(ab'2) ou um simples fragmento Fv.

Um recombinante, anticorpo neutralizante, J695 particularmente preferido, que podem ser utilizados na invenção foi produzida por mutagênese sítio-direcionada de contato e resíduos aminácidos de hipermutação do anticorpo Y61 (ver Exemplo 2 da Patente dos EUA No. 6.914.128 e seção III abaixo). J695 difere a partir do Y61 por uma substituição Gly a Tyr em Y61 na posição 50 do CDR2 de cadeia leve e por substituição Gly por Tyr na posição 94 do CDR3 de cadeia pesada e leve do J695 são mostrados na SEQ ID NOs: 25 e 26, respectivamente, as CDR2s de cadeia pesada e leve de J695 são mostrados na SEQ ID NO:31 e a VL de J695 tem a sequência aminoácida da SEQ ID NO:32 (essas sequências são também mostradas nas Figuras 1A-1D da Patente dos EUA No.



6.914.128, alinhada com Joe9).

Consequentemente, em outro aspecto, a invenção caracteriza um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que a) inibe proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA in vitro com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos; b) tem um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25; e c) tem um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26.

Na modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado na invenção tem um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27, e CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado na invenção tem um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29, e o CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30.

Em ainda outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, utilizado na invenção tem uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida de SEQ ID NO:31, e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:32.

Em certas modalidades, o anticorpo de comprimento inteiro compreende uma região constante de cadeia pesada, tais como regiões contante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE e qualquer variante alotípico aqui como descrito em Kabat (Kabat E.A. *et al* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação do NIH No. 91-3242). Preferivelmente, a região constante da cadeia pesada do anticorpo é uma região constante de cadeia pesada de IgG1. Alternativamente, a porção do anticorpo pode ser um fragmento Fab, um fragmento F(ab'<sub>2</sub>) ou um fragmento Fv de cadeia única.

Mutações adicionais das sequências consenso preferidas para CDR3, CDR2 e CDR1 de anticorpos na linhagem a partir de Joe9 para J695, ou a partir da linhagem Y61 para J695, podem ser feitas para prover anticorpos anti-IL-12 adicionais da invenção. Tais métodos de modificação podem ser feitos utilizando técnicas de biologia molecular padrões, tais como mutagênese por PCR, contato individual em alvo ou hipermutação de resíduos aminoácidos nos CDRs de cadeia leve e/ou cadeia pesada, seguido por cinética e análise funcional dos anticorpos modificados como aqui descrito (por exemplo, ensaios de neutralização descritos no Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128, e por análise BIAcore, como descrito no Exemplo 5 da Patente dos EUA No. 6.914.128).

Consequentemente, em outro aspecto a invenção retrata uso de um anticorpo hu-

mano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que

a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um IC50 de  $1 \times 10^{-6}$  M ou menos;

b) compreende um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:1, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:3 e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:5, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa de Koff não mais que 10 vezes mais alta que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:1, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:3, e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:5; e

c) compreende um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:2, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:4, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:6, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa Koff não mais que 10 vezes maior que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:2, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:4, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:6.

Em outro aspecto a invenção retrata o uso de um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que

a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) compreende um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:9, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:11 e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:13, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa de Koff não mais que 10 vezes mais alta que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:9, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:11, e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:13; e

c) compreende um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida

da SEQ ID NO:10, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:12, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:14, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa Koff não mais que 10 vezes maior que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:10, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:12, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:14.

Um versado na técnica também apreciará que mutações adicionais para as regiões CDR de um anticorpo, por exemplo, no Y61 ou em J695, pode ser feito para prover anticorpos anti-IL-12 adicionais da invenção. Tais métodos de modificação podem ser feitos utilizando técnicas de biologia molecular padrões, como descrito. A análise funcional e cinética dos anticorpos modificados pode ser feita como descritos no Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128 e Exemplo 5 da Patente dos EUA No. 6.914.128, respectivamente. Modificações de resíduos individuais de Y61 que levam a identificação do J695 são mostradas nas Figuras 2A-2H da Patente dos EUA No. 6.914.128 e são descritos no Exemplo 2 da Patente dos EUA No. 6.914.128.

Conseqüentemente, em outro aspecto a invenção retrata uso de um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que

a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) compreende um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:17, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:19 e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:21, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa de Koff não mais que 10 vezes mais alta que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:17, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:19, e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:21; e

c) compreende um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:18, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:20, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:22, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o

referido mutante tem uma taxa Koff não mais que 10 vezes maior que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:18, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:20, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:22.

Em outro aspecto a invenção retrata usa um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que

a) inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de PHA *in vitro* com um IC50 de  $1 \times 10^{-9}$  M ou menos;

b) compreende um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27 e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa de Koff não mais que 10 vezes mais alta que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25, um CDR2 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27, e um CDR1 de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29; e

c) compreende um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30, ou um mutante do mesmo tendo uma ou mais substituições aminoácidas em uma posição de mutagênese seletiva preferida ou uma posição de hipermutação, em que o referido mutante tem uma taxa Koff não mais que 10 vezes maior que o anticorpo compreendendo um CDR3 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26, um CDR2 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28, e um CDR1 de cadeia leve compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê o uso de um anticorpo humano isolado, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, que neutralizam a atividade da IL-12 humana, em pelo menos um IL-12 primado adicional selecionado a partir do grupo consistindo de IL-12 babuíno, IL-12 marmoset (um tipo de macaco), IL-12 de chipanzé, IL-12 cynomolgus (tipo de macaco) e IL-12 reso, mas que não neutraliza a atividade da IL-12 de camundongo.

#### Seleção de Anticorpos Humanos Recombinantes

Anticorpos humanos recombinantes que podem ser utilizados na invenção podem

ser isolados por seleção de uma biblioteca de anticorpo combinatorial recombinante, preferivelmente uma biblioteca que revela o fago scFv, preparado usando cDNAs de VL e VP humano preparado a partir do mRNA derivado a partir de linfócitos. Métodos para identificar anticorpos que podem ser utilizados nos métodos e composições da invenção são descritos na Patente dos EUA No. 6.914.128, incorporados aqui por referência. Em adição aos kits comercialmente disponíveis para gerar bibliotecas que revelam fago (por exemplo, a Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo no. 27-9400-01; e o kit que revela fago Stratagene SurfZAP®, catálogo no. 240612), exemplos de métodos e reagentes particularmente fácil para uso em gerar e selecionar bibliotecas que revelam anticorpo podem ser encontrados em, por exemplo, Kang *et al* Publicação PCT No. WO 92/18619; Winter *et al* Publicação PCT No. WO 92/20791; Breitling *et al*, Publicação PCT No. WO 93/01288; McCafferty *et al*, Publicação PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al* Publicação PCT No. WO 92/09690; Fuchs *et al* (1991) *bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al* (1992) *Hum Antibod Hybridomas*, 3:81-85; Huse *et al* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al*, Publicação PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al*, Publicação PCT No. Wo 92/09690; Fuchs *et al* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 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) *J Mol 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; e Barbas *et al* (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

As bibliotecas de anticorpo utilizadas neste método são preferivelmente bibliotecas de scFv preparadas a partir de cDNAs de VL e VP. As bibliotecas de anticotpo scFv são preferivelmente selecionadas utiliando IL-12 humana recombinante como o antígeno para selecionar sequências de cadeia pesada e leve humanas tendo um atividade de ligação para a IL-12. Para selecionar a especificidade dos anticorpos para a subunidade p35 da IL-12 ou o heterodímero p70, ensaios de seleção foram feitos em presença de excesso de subunidade p40 livre. Preferências de subunidades podem ser determinadas, por exemplo, por titulação micro-Friguet, como descrito no Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128.

Uma vez segmentos de VL e VP humano iniciais são selecionados. Experimentos de "mistura e adapta", em que diferentes pares dos segmentos VL e VP selecionados são filtrados para ligação à IL-12, são feitos para selecionar as combinações de pares VL/VP preferidos (ver Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128). Adicionalmente, para ainda melhorar a afinidade e/ou diminuir a raxa off constante para a ligação da hIL-12, os segmentos VL e VP do(s) par(s) VL/VP preferido(s) pode(m) ser aleatoriamente mutado(s), preferivelmente dentro da região CDR3 da VP e/ou VL, em um processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação da afinidade dos anticorpos durante a

resposta imune natural. Esta maturação de afinidade *in vitro* pode ser realizada por amplificar as regiões da VP e VL utilizando iniciadores de PCR complementares para o CDR3 VP ou CDR3 VL, respectivamente, cujos iniciadores têm sido "spiked" com uma mistura aleatória das quatro bases nucleotídicas em certas posições tal que os produtos de PCR resultantes codificam os segmentos VP e VL em que mutações aleatórias têm sido introduzidas nas regiões VP e/ou VL da CDR3. Esses segmentos VP e VL mutados aleatoriamente podem ser re-selecionados e re-filtrados para ligação à hIL-12 e sequências que exibem alta afinidade e uma baixa taxa off para ligação à IL-12 podem ser selecionadas. Tabela 2 (ver Apêndice A da Patente dos EUA No. 6.914.128) mostra anticorpos que mostram especificidade/afinidade de ligação produzida como um resultado da maturação de afinidade *in vitro*.

Seguindo a seleção, isolamento e separação de um anticorpo anti-hIL-12 da invenção a partir da biblioteca que revela imunoglobulina recombinante, ácido nucléico codificando o anticorpo selecionado pode ser recuperado a partir de partícula(s) fago (por exemplo, a partir do genoma fago) e subclonado em outros vetores de expressão por técnicas de DNA recombinante padrão. Se desejado, o ácido nucléico pode ser ainda manipulado para criar outras formas de anticorpo da invenção (por exemplo, ligado ao ácido nucléico codificando domínios de imunoglobulina adicionais, tais como regiões constantes adicionais). Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado por seleção de uma biblioteca combinatorial, o DNA codificando o anticorpo é clonado em um vetor de expressão recombinante e introduzido em células hospedeiras mamífero, como descrito em detalhes adicionais na Seção IV abaixo.

Métodos para selecionar anticorpos de ligação da IL-12 humana por tecnologia de revelação de fago, e maturação de afinidade dos anticorpos selecionados por mutagênese sítio-direcionada ou aleatória das regiões CDR são descritas em detalhes adicionais no Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128.

Como descrito no Exemplo 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128, selecionado de bibliotecas de cDNA de VL e VP humana identificou uma série de anticorpos anti-IL-12, dos qual o anticorpo Joe 9 foi selecionado para desenvolvimento adicional. Uma comparação da região variável de cadeia pesada do Joe 9 com as sequências de linha germinativa da cadeia pesada a partir da base de dados VBASE, revelou que Joe 9 foi similar à sequência linha germinativa COS-3. COS-3 pertence à família VH3 de sequências linha germinativa.

A família VH3 é parte do repertório linha germinativa VP humano que é agrupado em sete famílias, VH1-VH7, baseado na homologia da sequência nucleotídica (Tomlinson *et al* (1992) J. Mol. Biol. 227, 776-798 e Cook *et al* (1995) Immunology Today, 16, 237-242). A família VH3 contém o número mais alto de membros e fa a maior contribuição do repertório linha germinativa. Para qualquer dada sequência de anticorpo linha germinativa VH3 humana, a identidade da sequência aminoácida dentro da família VH3 inteira é alta (Ver, por e-

xemplo, Tomlinson *et al* (1992) *J Mol Biol*, 227, 776-798 e Cook *et al* (1995) *Immunology Today*, 16, 237-242). A variação da identidade de sequência aminoácida entre qualquer de duas sequências VP linha germinativa da família VH3 varia a partir de resíduos 69-98 de aproximadamente 100 resíduos VP (isto é, 69-98% de homologia de sequência aminoácida entre quaisquer de suas sequências VP linha germinativa). Para a maioria dos pares das sequências linha germinativa existe pelo menos 80 ou mais resíduos aminoácidos idênticos (isto é, pelo menos 80% de homologia da sequência aminoácida). O alto grau de homologia de sequência aminoácida entre os membros da família VH3 resulta em certos resíduos aminoácidos sendo presente em sítios chaves nas regiões CDR e estrutura da cadeia VP. Esses resíduos aminoácidos conferem características estruturais sob os CDRs.

Estudos de estruturas de anticorpos têm mostrado que conformações de CDR podem ser agrupadas em famílias de estruturas CDR canônicas nos resíduos aminoácidos que ocupam certas posições nas regiões CDR e estrutura. Consequentemente, existem conformações CDR locais similares em anticorpos diferentes que têm estruturas canônicas com resíduos aminoácidos chaves idênticos (Chothia *et al* (1987) *J Mol Biol*, 196, 901-917 e Chothia *et al* (1989) *Nature*, 342, 877-883). Dentro da família VH3 existe uma conservação da identidade do resíduo aminoácido nos sítios chave para as estruturas canônicas CDR1 e CDR2 (Chothia *et al* (1992) *J Mol Biol*, 227, 799-817).

O gene VH linha germinativa COS-3, é um membro da família VH3 e é uma variante do alelo VP linha germinativa 3-30 (DP-49). COS-3, difere a partir das sequências aminoácidas Joe 9 VP em somente 5 posições. O alto grau de homologia sa sequência aminoácida entre Joe 9 VP e Cos-3, e entre Joe 9 VP e outros membros da família VH3 também confere um alto grau de homologia estrutural CDR (Chothia *et al* (1992) *J. Mol. Biol.*, 227, 799-817; Chothia *et al* (1987) *J Mol Biol.*, 196, 901-917 e Chothia *et al* (1989) *Nature*, 342, 877-883).

O versado na técnica apreciará que baseado na alta sequência aminoácida e similaridade estrutural canônica para Joe 9, outros membros da família VH3 podem também ser utilizados para gerar anticorpos que ligam à IL-12 humana. Este pode ser feito, por exemplo, por selecionar técnicas apropriadas de VL por mistura de cadeia (Winter *et al* (1994) *Annual Rev. Immunol.*, 12, 433-55), ou por montagem de CDRs a partir de roedores ou outro anticorpo humano incluindo CDRs a partir de anticorpos da invenção em uma estrutura da família VH3.

O repertório linha germinativa lambda V humano é agrupado em 10 famílias baseadas na homologia sa sequência nucleotídica (Williams *et al* (1996) *J Mol Biol*, 264, 220-232). Uma comparação da região variável de cadeia leve do Joe 9 com as sequências linha germinativa de cadeia leve a partir da base de dado VBASE, revelou que Joe 9 foi similar à linha germinativa lambda DPL8. A VL do Joe 9 difere a partir da sequência DPL8 em somen-

te quatro posições estrutura, e é altamente homóloga para as sequências estrutura dos membros da família V $\lambda$ 1. Baseados na alta homologia da sequência aminoácida e similaridade estrutural canônica para Joe 9, outros membros da família V $\lambda$ 1 podem também ser utilizados para gerar anticorpos que se ligam a IL-12 humana. Este pode ser feito, por exemplo, por selecionar uma VP apropriada por técnicas de mistura de cadeia (Winter *et al*,  
5 Supra, ou por montagem de CDRs a partir de um roedor ou outro anticorpo humano incluindo CDRs a partir de anticorpos desta invenção em um estrutura da família V $\lambda$ 1.

Os métodos da invenção são tencionados incluir anticorpos recombinantes que se ligam a hIL-12, compreendendo uma região variável de cadeia pesada derivada a partir de  
10 um membro da família VH3 de sequências linha germinativa, e uma região variável de cadeia leve derivada a partir de um membro da família V $\lambda$ 1 das sequências linha germinativa. Além disso, o versado na técnica apreciará que qualquer membro da sequência de cadeia pesada da família VH3 pode ser combinado com qualquer membro da sequência de cadeia leve da família V $\lambda$ 1.

Aqueles versados na técnica também apreciarão que polimorfismos da sequência de DNA que levam a mudanças nas sequências aminoácidas da linha germinativa podem existir dentro de uma população (por exemplo, a população humana). Tal polimorfismo gênico nas sequências linha germinativa pode existir entre indivíduos dentro de uma população devido à variação alélica natural. Tais variações alélicas naturais podem tipicamente resultar em uma variação de 1-5% na sequência nucleotídica de um gene. Qualquer e todas tais variações nucleotídicas e polimorfismos aminoácidos resultantes nas sequências linha germinativa que são o resultado da variação alélica natural são tencionadas estar dentro do objetivo da invenção.  
15

Consequentemente, em um aspecto, a invenção retrata um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que tem as seguintes características:  
25

a) que se liga à IL-12 humana e dissocia a partir da IL-12 com uma taxa Koff constante de  $0,1s^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância plásmon de superfície, ou que inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de proliferação blástica de fitoemaglutinina *in vitro* (ensaio de PHA) com um IC50 de  $1 \times 10^{-6}$  M ou menos.  
30

b) tem uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir de um membro da família linha germinativa VH3, em que a região variável de cadeia pesada tem uma mutação em uma posição de contato ou hipermutação com uma atividade aumentada do resíduo aminoácido.

c) tem um região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir de um membro da família linha germinativa V $\lambda$ 1, em que a região variável de cadeia leve tem uma mutação em uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com uma atividade de resíduo aminoácido aumen-  
35



tada.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou antígeno ligador tem mutação na cadeia pesada CDR3. Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou ligação de antígeno tem mutação na cadeia leve CDR3. Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou ligação de antígeno tem mutação na cadeia pesada CDR2. Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou ligação de antígeno tem mutação na cadeia leve CDR2. Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou ligação de antígeno tem mutação na cadeia pesada de CDR1. Em outra modalidade preferida, o anticorpo humano isolado, ou ligação de antígeno tem mutação na cadeia leve CDR1.

Em versado na técnica apreciará que baseado na alta similaridade da sequência aminoácida entre membros da família linha germinativa VH3, ou entre membros da família linha germinativa VL1 de cadeia leve, que muta para sequências linha germinativas podem prover anticorpos adicionais que se ligam à IL-12 humana. Tabela 1 da Patente dos EUA NO. 6.914.128 (ver também Apêndice A da Patente dos EUA No. 6.914.128) mostra as sequências linha germinativa dos membros da família VH3 e demonstra a homologia de sequência significativa dentro dos membros da família. Também mostrado na tabela 1 da Patente dos EUA No. 6.914.128 são as sequências linha germinativa para membros da família VL1. As sequências da cadeia pesada e leve do Joe 9 são providos como uma comparação. Mutações para as sequências linha germinativa dos membros da família VH3 e VL1 podem ser feitos, por exemplo, nas mesmas posições aminoácidas como àquelas feitas nos anticorpos da invenção (por exemplo, mutações em Joe 9). As modificações podem ser feitas utilizando técnicas de biologia molecular padrão, tais como mutagênese PCR, resíduos aminoácidos individuais alvo nas sequências linha germinativa, seguido por análise cinética e funcional dos anticorpos modificados como aqui descrito (por exemplo, ensaios de neutralização descritos no Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128 e por análise BIAcore, como descrito no Exemplo 5 da Patente dos EUA No. 6.914.128.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção retrata usa de um anticorpo humano isolado, ou uma porção ligadora de anticorpo do mesmo, que tem as seguintes características:

a) tem uma região de cadeia pesada compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 595-667, em que a região variável de cadeia pesada tem uma mutação em uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com um resíduo aminoácido de atividade aumentada.

b) tem uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir do grupo consistindo da SEQ ID NOs: 669-675, em que a região variável de cadeia pesada tem uma mutação em uma posição de mutagênese seletiva pre-

ferida, posição de contato ou hipermutação com um resíduo aminoácido de atividade aumentado.

Um versado na técnica apreciará que baseado na alta similaridade da sequência aminoácida entre Joe 9 e COS-3 da sequência linha germinativa de cadeia pesada, e entre  
5 sequência linha germinativa Joe 9 e DPL8 lambda, que outras mutações para as regiões CDR dessas sequências linha germinativas podem prover anticorpos adicionais que se ligam a IL-12 humana. Tais métodos de modificação podem ser feitos utilizando técnicas de biologia molecular padrões como descrito acima.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção retrata usa um anticorpo humano iso-  
10 lado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que tem as seguintes características:

a) que se liga à IL-12 humana e dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa Koff constante de  $0,1s^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância plásmon de superfície, ou que inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de proliferação blástica de fitoemaglutinina *in vitro* (ensaio de PHA) com um IC50 de  $1 \times 10^{-6}$  M ou menos.

b) tem uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência aminoá-  
15 cida linha germinativa COS-3, em que a região variável de cadeia pesada tem uma mutação na posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com uma atividade aumentada do resíduo aminoácido.

c) tem uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência aminoá-  
20 cida linha germinativa DPL8, em que a região variável de cadeia leve tem uma mutação em uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com uma atividade de resíduo aminoácido aumentada.

Devido a certos resíduos aminoácidos ocupando sítios chaves no CDR e regiões  
25 estruturais na região variável de cadeia leve e pesada, estruturas retratadas são conferidas nessas regiões. Em particular, as regiões CDR2 e CDR1 são pacientes para classificações estruturais canônicas. Desde que existe um alto grau de homologia das sequências aminoácidas entre membros da família, essas retrata canônicas estão entre membros da família. Os versados na técnica apreciarão que modificações nos resíduos aminoácidos que conferem essas estruturas canônicas devem produzir anticorpos adicionais que se ligam a IL-12.  
30 As modificações podem ser feitas utilizando técnicas de biologia molecular padrão como descrito acima.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção retrata usam um anticorpo hu-  
mano isolado, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo, que tem as seguintes caracte-  
rísticas:

a) que se liga à IL-12 humana e dissocia a partir da IL-12 humana com uma taxa Koff  
35 constante de  $0,1s^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância plásmon de superfície, ou que inibe a proliferação blástica por fitoemaglutinina em um ensaio de proliferação blástica

de fitoemaglutinina *in vitro* (ensaio de PHA) com um IC50 de  $1 \times 10^{-6}$  M ou menos.

b) tem uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir de um membro da família linha germinativa VH3, em que a região variável de cadeia pesada compreende uma CDR2 que é estruturalmente similar ao CDR2s a partir dos membros da família linha germinativa VH3, e um CDR1 que é estruturalmente dimilar aos CDR1s a partir dos membros da família linha germinativa, e em que a região variável da cadeia pesada tem uma mutação em uma posição em uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com uma atividade aumentada do resíduo aminoácido;

c) tem um região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência aminoácida selecionada a partir de um membro da família linha germinativa VL1, em que a região variável de cadeia leve compreende um CDR2 que é estruturalmente similar aos CDR2s a partir de outros membros da família linha germinativa VL1, e um CDR1 que é estruturalmente similar aos CDR1s a partir de outros membros da família linha germinativa VL1, e em que a região variável de cadeia leve tem uma mutação posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação com uma atividade de resíduo aminoácido aumentada.

Anticorpos humanos recombinantes utilizados na invenção têm regiões constantes e variáveis que são homólogos às sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana selecionada a partir de uma base de dados VBASE. Mutações para os anticorpos humanos recombinantes (por exemplo, por mutagênese aleatória ou mutagênese PCR) resultam em aminoácidos que não são codificados por sequências de imunoglobulinas de linha germinativa humana. Também, bibliotecas de anticorpos recombinantes que foram derivadas a partir de doadores humanos conterão sequências de anticorpos que diferem a partir de sequências linha germinativa correspondentes devido ao processo normal de mutação somática que ocorre durante o desenvolvimento da células B. Deve ser notado que se as sequências "linha germinativa" obtidas por amplificação por PCR codificam diferenças aminoácidas nas regiões estrutura a partir da verdadeira configuração linha germinativa (isto é, "mutação retrógrada" dos resíduos estrutura para a configuração linha germinativa). Então, a presente invenção pode opcionalmente incluir um passo mutação retrógrada. Para fazer isso, as sequências aminoácidas de cadeia pesada e leve codificados pela linha germinativa (como encontrado como exemplo na base de dados VBASE) são primeiro comparados às sequências aminoácidas estrutura de cadeia pesada e leve de imunoglobulina mutada para identificar resíduos aminoácidos na sequência estrutura da imunoglobulina mutada que diferem a partir de sequências das linhas germinativas mais próximas. Então, os nucleotídeos apropriados da sequência imunoglobulina mutada são mudadas de volta para corresponder à sequência linha germinativa, utilizando o código genético para determinar quais mudanças

de nucleotídeos devem ser feitas. Mutagênese da sequência estrutura da imunoglobulina mutada é realizada por métodos padrões, tais como mutagênese mediada por PCR (em que os nucleotídeos mutados são incorporados nos iniciadores PCR tal que o produto PCR contém as mutações) ou mutagêneses sítio-direcionadas. O papel de cada aminoácido identificado como candidato para mutação retrógrada deve ser investigado para um papel direto ou indireto na ligação de antígeno e qualquer aminoácido encontrado após mutação para afetar qualquer característica desejável do anticorpo humano deve não ser incluído no anticorpo humano final; como um exemplo, aminoácidos aumentadores de atividade identificados pela abordagem de mutagênese seletiva não será sujeita a mutação retrógrada. Ensaio para determinar as características do anticorpo resultando a partir de mutagênese podem incluir ELISA, ELISA competitivo, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* e/ou (ver, por exemplo, Exemplo 3 da Patente EUA No. 6.914.128) imunistoquímica com seções tissulares a partir de várias fontes (incluindo humano, primata e/ou outras espécies).

Para minimizar o número de aminoácidos sujeitos à mutação retrógrada aquelas posições aminoácidas encontradas para serem diferentes da sequência linha germinativa mais próxima mas idêntica para o aminoácido correspondente em uma segunda sequência linha germinativa pode permanecer, provido que a sequência linha germinativa segundo é idêntico e colinear à sequência do anticorpo humano da invenção por pelo menos 10, preferivelmente 12 aminoácidos, ou ambos os lados do aminoácido em questão. Isto pode assegurar que qualquer peptídeo epítipo apresentado ao sistema imune por células apresentadoras de antígeno em um paciente tratado com o anticorpo humano da invenção não deve ser estranho mas idêntico ao auto-antígeno; isto é, a imunoglobulina codificada pela segunda sequência linha germinativa. Mutação retrógrada pode ocorrer em qualquer estágio de otimização de anticorpo; preferivelmente, mutação retrógrada ocorre diretamente antes ou após a abordagem de mutagênese seletiva. Mais preferivelmente, mutação retrógrada ocorre diretamente antes da abordagem de mutagênese seletiva.

### III. Modificações para Posições de Mutagêneses Seletivas Preferidas, Posições de Contato e/ou Hipermutação

Tipicamente, seleção de anticorpos com afinidades melhoradas podem ser realizados utilizando métodos revelados, como descrito na seção II acima e na Patente dos EUA No. 6.914.128, incorporado aqui por referência. Este pode ser realizado por combinações de mutação aleatória de resíduos CDR e gerando grandes bibliotecas contendo anticorpos de sequências diferentes. Entretanto, para essa seleção de métodos para trabalhar, a reação anticorpo-antígeno deve tender para o equilíbrio para permitir, ao longo do tempo, ligação preferencial de anticorpos de afinidade mais alta para o antígeno. Condições de seleção que podem permitir o equilíbrio para ser estabilizado não devem ser determinadas (presumivelmente devido às interações não específicas entre o antígeno e partícula fago) quando os

métodos que revelam fago foram utilizados para aumentar a afinidade de anticorpos anti-IL-12 selecionados, alcançando certo nível de afinidade alcançada (isto é, aquela do anticorpo Y61). Consequentemente, anticorpos com afinidades ainda maiores não devem ser selecionados por métodos revelados de fago. Então, para pelo menos certos anticorpos ou antígenos, métodos revelados para fago são limitados em sua habilidade de selecionar anticorpos com uma especificidade/afinidade de ligação altamente aumentada. Consequentemente, um método denominado Abordagem de Mutagênese Seletiva que não requer maturação de afinidade revelada de fago de anticorpos, foi estabelecida para superar esta limitação e é provido pela invenção. Embora esta Abordagem de Mutagênese Seletiva foi desenvolvida para superar limitações usando o sistema de revelação de fago, deve ser notado que este método pode também ser utilizado com o sistema de revelação de fago. Além disso, a abordagem mutagênese seletiva pode ser utilizada para melhorar a atividade de qualquer anticorpo.

Para melhorar a atividade (por exemplo, afinidade ou atividade de neutralização) de um anticorpo, idealmente um pode querer mutar cada posição de CDR em ambas as cadeias pesada e leve para cada outro resíduo aminoácido possível. Entretanto, desde que sejam, na média, 70 posições CDR dentro de um anticorpo, tal como uma abordagem pode consumir muito tempo e trabalho intensivo. Consequentemente, o método da invenção permite um melhorar a atividade do anticorpo por mutar somente certos resíduos selecionados dentro dos CDRs de cadeia pesada e/ou leve. Além disso, o método da invenção permite melhoramento na atividade do anticorpo sem afetar outras propriedades desejáveis do anticorpo.

Determinando que os resíduos aminoácidos de uma região variável de anticorpo estão em contato com um antígeno não pode ser acuradamente predita baseada na sequência primária ou suas posições dentro da região variável. Apesar disso, alinhamentos de sequências a partir de anticorpos com especificidades diferentes conduziram por Kabar *et al* têm identificado os CDRs como regiões locais dentro de regiões variáveis que diferem significativamente entre anticorpos (Kabat *et al* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-393, Kabat, E.A. *et al* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH No. 91-3242). Estudos estruturais têm mostrado que a superfície de ligação do antígeno é formada por resíduos aminoácidos presentes nos CDRs. Outros resíduos aminoácidos fora de CDR são também conhecidos desempenhar papéis estruturais ou ser diretamente envolvidos na ligação de antígeno. Assim, para cada par de antígeno-anticorpo, resíduos aminoácidos dentro e fora dos CDRs podem ser importantes.

Os estudos de alinhamento de sequência por Tomlison *et al* identificaram um número de posições na cadeia pesada e leve de CDR1 e CDR2, e em uma porção da cadeia

kappa CDR3 que são frequentes em sítios de mutação somática (Tomlison *et al* (1996) J. Mol. Biol. 256: 813-817). Em particular, posições H31, H31B, H33, H33B, H52B, H56, H58, L30, L31, L50, L53, L91, L93 e L94 foram identificados como sítios frequentes para mutação somática. Entretanto, esta análise exclui a importante região CDR3 da cadeia pesada, e seções do CDR3 de cadeia leve que são conhecidos por situar-se no centro de um sítio de ligação de anticorpo, e potencialmente provê interações importantes com um antígeno. Além disso, Tomlison *et al* propõe que a diversidade somática sozinha não necessariamente prediz um papel de um aminoácido específico na ligação do antígeno, e sugere resíduos aminoácidos conservados que contactam o antígeno, e resíduos aminoácidos diversos que não contactam antígeno. Esta conclusão é ainda suportada por estudos mutacionais no papel de mutações somáticas da afinidade do anticorpo (Sharon (1990), PNAS, 87:4814-7). Dezenove mutações somáticas em um anticorpo de alta afinidade anti-p-azofenilarsonato (Ars) foram simultaneamente substituído com seus resíduos da linha germinativa correspondente, gerando uma versão linha germinativa do anticorpo anti-Ars que teve duzentas vezes perda de atividade. A afinidade inteira do anticorpo anti-Ars pode ser recuperada por restaurar somente três das dezenove mutações somáticas, demonstrando que muitas mutações somáticas podem ser permitidas que não contribuem para atividade de ligação ao antígeno.

O resultado pode ser explicado em parte pela natureza da diversidade de anticorpo do mesmo. Células B imaturas podem produzir inicialmente anticorpos de baixa afinidade que reconhecem um número de antígenos próprios ou não próprios. Além disso, anticorpos podem ser submetidos no curso das variações de sequência de maturação de afinidade que podem causar auto-reatividade. Hipermutação de tais anticorpos de baixa afinidade podem servir para abolir auto-reatividade ("seleção negativa") e afinidade aumentada para o antígeno externo. Além disso, a análise de dados primários e estruturais de um grande número de anticorpos não provêm um método de predizer ou (1) o papel de sítios de hipermutação somática no processo de maturação de afinidade versus o processo de diminuição de afinidade para antígenos não queridos, ou (2) como um dado aminoácido contribui para as propriedades do par de antígeno-anticorpo específico.

Outras tentativas de endereçar o papel dos resíduos aminoácidos específicos no reconhecimento do antígeno foram feitos por análise de um número de estruturas cristais dos complexos antígeno-anticorpo (MacCallum *et al* (1996) J Mol Biol 262:732-745). O papel potencial das posições localizadas dentro e fora dos CDRs foi indicado. Posições nos CDRs envolvidas na ligação do antígeno em mais que 10 a 26 estruturas analisadas incluíam H31, H33, H50, H52, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98 e H100 na cadeia pesada e L30A, L32, L91, L92, L93, L94, L96 na cadeia leve. Entretanto, os autores notaram que predição de contatos de antígenos utilizando esses e outros dados podem exceder sob posições de contato preditas, levando para a especulação que uma estratégia diferente pode ter que ser

aplicada para diferentes antígenos.

Pini *et al*, descreve resíduos múltiplos aleatórios nas sequências CDR de anticorpo em uma grande biblioteca que revela fago para rapidamente aumentar a afinidade do anticorpo (Pini *et al* (1998) J Biol Chem 273:21769-21776). Entretanto, os anticorpos de alta  
5 afinidade discutidos por Pini *et al* tiveram mutações em um total de oito posições, e uma análise reducionista das quais mudanças são absolutamente requeridas para melhorar a afinidade do anticorpo se torna impraticável porque o grande número de possíveis combinações a ser testado para o menor número de aminoácidos requerido.

Além disso, resíduos múltiplos aleatórios podem não necessariamente preservar  
10 outras propriedades desejadas do anticorpo. Propriedades desejáveis ou características de um anticorpo são reconhecidas na técnica e incluem, por exemplo, preservação de reatividade não cruzada, por exemplo, com outras proteínas ou tecidos humanos e preservação de sequências anticorpos que estão perto de melhoramento de sequências de imunoglobulina linha germinativa humanas de potência de neutralização. Outras propriedades desejáveis  
15 ou características incluem habilidade para preservar espécies de reatividade cruzada, habilidade para preservar a especificidade do epítipo e habilidade para preservar altos níveis de expressão de proteína em células mamíferas. As propriedades desejáveis ou características podem ser observadas ou medidas utilizando técnicas reconhecidas na arte incluindo, mas não limitados a ELISA, ELISA competitivo, ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* (ver,  
20 por exemplo, Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128), imunistoquímica com seções de tecido a partir de fontes diferentes incluindo humano, primata ou outras fontes como a necessidade podem ser, e estudos em células mamíferas utilizando expressão transiente ou expressão estável.

Em adição, o método de Pini *et al* pode introduzir mais mudanças que o número  
25 mínimo atualmente requer para melhorar a afinidade e pode levar aos anticorpos iniciar a formação do anticorpo anti-humano (HAMA) em pacientes humanos. Adicionalmente, como discutido em outro lugar, o fago revela como demonstrado aqui, ou outro método relacionado incluindo revelação de ribossomo pode não funcionar apropriadamente sob pesquisa de certas afinidades entre anticorpo e antígeno e as condições requeridas para alcançar  
30 equilíbrio não podem ser estabelecidas em um tempo específico razoável por causa de interações adicionais incluindo interações com outros componentes fago ou ribossomo e o antígeno.

O versado na técnica pode juntar informação científica interessante na origem da diversidade do anticorpo a partir dos ensinamentos das referências discutidas acima. A presente invenção, entretanto, provê um método para aumentar a afinidade do anticorpo de um  
35 par antígeno-anticorpo específico enquanto outras retrata relevantes ou características desejáveis do anticorpo. Isto é especificamente importante quando considerando a desejabili-

dade de impedir uma massa de características diferentes em um anticorpo específico incluindo ligação ao antígeno.

Se o anticorpo inicial tem propriedades desejáveis ou características que precisam ser retidos, uma abordagem de mutagênese seletiva pode ser a melhor estratégia para preservar essas propriedades desejáveis enquanto melhorar a atividade do anticorpo. Por exemplo, na mutagênese de Y61, o objetivo foi aumentar a afinidade para hIL-12, e para melhorar a potência da neutralização do anticorpo enquanto preservando as propriedades desejadas. Propriedades desejadas do Y61 incluíram (1) preservação da reatividade não cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, (2) preservação da fina especificidade do epítopo, isto é, reconhecendo um epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 (p40/p35), assim prevenindo a interferência da ligação a partir do p40 solúvel livre; e (3) geração de um anticorpo com sequências aminoácidas de cadeia pesada e leve que foram tão próximos com possível para suas respectivas sequências de imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade, o método da invenção provê uma abordagem de mutagênese seletiva como uma estratégia para preservação das propriedades desejáveis ou características do anticorpo enquanto melhorar a afinidade e/ou potência de neutralização. O termo "abordagem de mutagênese seletiva" é como definido acima e inclui um método de mutar individualmente resíduos aminoácidos selecionados. Os resíduos aminoácidos a ser mutados podem primeiro ser selecionados a partir de posições de mutagênese seletiva preferidas, então a partir de posição de contato, e então a partir de posições de hipermutação. A posição individual selecionada pode ser mutada em pelo menos dois resíduos aminoácidos e o efeito da mutação, ambas, as propriedades desejadas do anticorpo e o melhoramento na atividade do anticorpo são determinados.

A abordagem da Mutagênese Seletiva compreende os passos de:

Selecionar posições candidatas na ordem de 1) posições de mutagêneses seletivas preferidas; 2) posições de contato; 3) posições de hipermutação e elegendo as posições baseadas na localização da posição dentro de regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo (CDR3 preferido sob CDR2 preferido sob CDR1);

Posições de mutagênese seletiva preferidas de candidatos mutados individualmente, hipermutação e/ou posições de contato a fim de eleger, para todas as possibilidades outros resíduos aminoácidos e analisando o efeito das mutações individuais na atividade do anticorpo a fim de determinação da atividade de resíduos aminoácidos de atividade aumentada;

Se necessário, fazer combinações gradativamente da atividade individual de resíduos aminoácidos de atividade aumentada e analisar o efeito de várias combinações na atividade dos anticorpos; selecionar anticorpos mutantes com resíduos aminoácidos de ati-



vidade aumentada e elegendo os anticorpos mutantes baseados na localização e identidade das substituições aminoácidas com respeito ao seu potencial imunogênico. A posição mais alta é dada para anticorpos mutantes que compreendem uma sequência aminoácida que quase idêntico a uma sequência de região variável que é descrita em uma base de dado  
5 linha germinativa, ou tem uma sequência aminoácida que é comparável a outros anticorpos humanos. Posição inferior é dada para anticorpos mutantes contendo uma substituição aminoácida que é raramente encontrada em ou sequências linha germinativa ou sequências de outros anticorpos humanos. A posição mais baixa é dada para anticorpos mutantes com uma substituição aminoácida que não tenha sido encontrada em uma sequência linha germinativa ou a sequência de outro anticorpo humano. Como revelado acima, anticorpos mu-  
10 tantes compreendendo pelo menos um resíduo aminoácido de atividade aumentada localizado em CDR3 é preferido sob CDR2 que é preferido sob CDR1. Os CDRs das regiões variáveis de cadeia pesada são preferidos sob aqueles da região variável de cadeia leve.

Os anticorpos mutantes podem também ser estudados para melhoria na atividade,  
15 por exemplo, quando comparado ao seu anticorpo parental correspondente. A melhoria na atividade do anticorpo mutante pode ser determinada, por exemplo, por ensaios de neutralização, ou especificidade/afinidade de ligação por análise de ressonância plásmom de superfície (ver Exemplo 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128). Preferivelmente, o melhoramento na atividade pode ser pelo menos 2-20 vezes mais alto que o anticorpo parental. O melhora-  
20 mento na atividade pode ser pelo menos "x1" a "x2" vezes mais alto que o anticorpo parental em que "x1" e "x2" são números inteiros entre e incluindo 2 a 20, incluindo variações dentro do estado de variação, por exemplo, 2-15, por exemplo, 5-10.

Os anticorpos mutantes com o resíduo aminoácido de atividade aumentada também podem ser estudados para determinar se pelo menos outra propriedade desejável tem  
25 sido retida após mutação. Por exemplo, com testes de anticorpos anti-hLL-12 para, (1) preservação de reatividade não cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, (2) preservação do reconhecimento do epítipo, isto é, reconhecimento de um epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 (p40/035), assim prevenindo a interferência de ligação a partir da p40 solúvel livre; e (3) geração de anticorpos com sequências aminoácidas  
30 de cadeia pesada e leve que estão tão próximas quando possível para suas respectivas sequências de imunoglobulina linha germinativa, e determinando que possa ser pelo menos provável elicitar uma resposta imune humana baseada no número de diferenças a partir da sequência linha germinativa. As mesmas observações podem ser feitas em um anticorpo tendo mais que um resíduo aminoácido de atividade aumentada, por exemplo, pelo menos  
35 dois ou pelo menos três resíduos aminoácidos de atividade aumentada, para determinar se a retenção da propriedade desejável ou característica ocorreu.

Um exemplo do uso de uma "abordagem de mutagênese seletiva", na mutagênese

de Y61 é descrita abaixo. As mutações individuais H31S→E, L50→Y, ou L94G→Y cada melhorou a atividade de neutralização do anticorpo. Entretanto, quando clones de combinação foram testados, a atividade do clone combinado H31S→E + L50→Y + L94G→Y não foi melhor que L50→Y + L94G→Y (J695). Assim, mudando o resíduo aminoácido linha germinativa Ser por Glu na posição 31 do CDR1 foi desnecessário para melhorar a atividade do J695 sob Y61. A abordagem de mutagênese seletiva dessa forma identificou o número mínimo de mudanças que contribuíram para atividade final, assim reduzindo o potencial imunogênico do anticorpo final e preservando outras propriedades desejadas do anticorpo.

DNA isolado codificando a VP e VL produzido abordagem de mutagênese selecionada pode ser convertida em genes de cadeia de anticorpo de comprimento inteiro, para genes de fragmento Fab como para um gene scFV, como descrito na seção IV. Para expressão de regiões VH e VL produzidas pela abordagem de mutagênese selecionada, vetores de expressão codificando a cadeia pesada e leve pode ser transfectada em uma variedade de células hospedeiras como descrito em detalhes na seção IV. Células hospedeiras preferidas incluem ou células hospedeiras procarióticas, por exemplo, *E. coli*, ou células hospedeiras eucaróticas, por exemplo, células de levedura, por exemplo, *S. cerevisiae*. Células eucarióticas mais preferidas são células hospedeiras mamíferas, descritos em detalhes na seção IV.

A abordagem de mutagênese seletiva provê um método de produzir anticorpos com atividades melhoradas sem maturação de afinidade anterior do anticorpo por outros meios. A abordagem de mutagênese seletiva provê um método de anticorpos de produção com afinidades melhoradas que têm sido sujeitos às mutações retrógradas. A abordagem de mutagênese seletiva também provê um método de melhorar a atividade de afinidade de anticorpos maduros.

O versado na técnica reconhece que a abordagem de mutagênese seletiva pode ser utilizada nas técnicas de manipulação de anticorpo padrão conhecido na técnica. Exemplos incluem, mas não são limitados a, anticorpos enxertados CDR, anticorpos quiméricos, fragmentos scFv, fragmentos Fab de anticorpos de comprimento inteiro e anticorpos humanos a partir de fontes, por exemplo, camundongos transgênicos.

Rápida análise mutacional em larga escala de anticorpos inclui transcrição e tradução in vitro utilizando tecnologia de revelação de ribossomo (ver, por exemplo, Hanes *et al* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4937-4942; Dall Acqua *et al* (1998) Curr. Opin. Struc. Biol. 8:443-450; He *et al* (1997) Nucleic Acid Res 25:5132-5134), e Patente dos EUA Nos. 5.643.768 e 5.658.754 emitido para Kawasaki. A abordagem de mutagênese seletiva também provê um método de produção de anticorpos com atividades melhoradas que podem ser selecionados utilizando técnicas de revelação de ribossoma.

Nos métodos da invenção, anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo

são ainda modificados por posições individuais alteradas nos CDRs do RVCP e/ou RVCL. Embora essas modificações possam ser feitas em anticorpos revelados por fago, o método é vantajoso em que ele pode ser feito com anticorpos que são expressos em outros tipos de sistemas hospedeiros, tal como sistemas de expressão em célula de bactéria, levedura ou mamífera. As posições individuais dentro dos CDRs selecionados para modificação são baseadas nas posições sendo uma posição de contato e/ou hipermutação.

Posições de contato preferidas e posições hipermutação como aqui definidos são mostrados na tabela 3 da Patente dos EUA No. 6.914.128 (ver Apêndice A da Patente dos EUA No. 6.914.128) e sua modificação de acordo com o método da invenção é descrito em detalhe no Exemplo 2 da Patente dos EUA No. 6.914.128. Posições de contato preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96. Posições de hipermutação preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 e L93. Resíduos aminoácidos mais preferidos (referidos como “posições de mutagênese seletivas preferidas”) são ambas, posições de contato e hipermutação e são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L50, L91, L93, L94. Posições de contato particularmente preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94.

Resíduos aminoácidos de atividade aumentada preferida substituem resíduos aminoácidos localizados nas posições selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L94 e L96. Resíduos aminoácidos de atividade aumentada mais preferidos substituem resíduos aminoácidos localizados nas posições H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L32, L50, L91, L92, L93, L94. Particularmente, resíduos aminoácidos de atividade aumentada preferidos substituem resíduos aminoácidos localizados nas posições selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94.

Em geral, o método da invenção envolve seleção de uma posição de mutagênese seletiva particularmente preferida, posição de contato e/ou hipermutação dentro de um CDR de cadeia pesada ou leve de um anticorpo parente de interesse, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutando aleatoriamente esta posição individual (por exemplo, por meios genéticos utilizando um oligonucleotídeo mutagênico para gerar uma “mini-biblioteca” de anticorpos modificados), ou mutando uma posição para aminoácidos desejados específicos, para identificar resíduos aminoácidos de atividade aumentada expressando, e purificar os anticorpos modificados (por exemplo, em um sistema hospedeiro que revela não fago), medindo a atividade dos anticorpos modificados para antígeno (por exemplo, por medir taxas

Koff por análise BIAcore), repetindo esses passos para outras posições CDR, como necessária, e combinando mutações individuais mostrado para ter atividade aumentada e testar se a(s) combinação(s) gera(m) um anticorpo com mesma atividade melhor (por exemplo, afinidade ou potência de neutralização) que o anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.

Conseqüentemente, em uma modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

b) selecionando a fim de 1) posição mutagênese seletiva preferida, 2) posição de contato, ou 3) posição de hipermutação dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação, assim identificando uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada, posição de contato ou hipermutação;

c) mutação individual a referida posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

d) avaliando a atividade do painel dos anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativas ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

e) opcionalmente, passos repetidos a) a d) para pelo menos uma outra posição mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

f) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutações individuais mostrados para ter atividade melhorada, para formar combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo; e

g) avaliando a atividade da combinação dos anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo; até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada, relativo ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é obtido. Preferivelmente, o anticorpo ou anticorpos selecionados têm uma atividade melhorada sem perda ou com retenção de pelo menos uma característica desejável ou propriedade do anticorpo parental como descrito acima. A característica desejada ou propriedade pode ser medida ou observada pelo versado na técnica utilizando técnicas reconhecidas na técnicas.

Posições de contato preferido são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96. Posições de hipermutação preferida são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 e L93. Posições de mutagênese seletivas mais preferi-

das são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93 e L94. Posições de contato particularmente preferidos são selecionados a partir do grupo consistindo de L50 e L94.

5 Em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) provendo um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

b) selecionando uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição contato ou hipermutação dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação;

10 c) mutação individual referida selecionou posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação em pelo menos dois resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções de ligação de antígeno do mesmo;

d) avaliando a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções de ligação de antígeno do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

15 e) opcionalmente, passos repetidos a) a d) para pelo menos outra posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

f) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada individuais mostrando ter atividade aumentada, para formar anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo; e

20 g) avaliando a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo com dois resíduos aminoácidos com capacidade aumentada, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

25 até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade aumentada, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é obtido.

Posições de contato preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96. Posições de hipermutação preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 e L93. Posições de mutagênese seletivas mais preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L32, L50, L91, L92, L93 e L94. Posições de contato particularmente preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94.

35 Em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmos, compreendendo:

a) prover um anticorpo parente ou porção ligadora do mesmo;

b) selecionar uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação;

5 c) mutação individual referida selecionou a posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, relativas ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido aumentador de atividade;

10 e) opcionalmente, repetindo passos a) a d) por pelo menos uma outra posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

f) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, três resíduos aminoácidos de atividade aumentada individuais mostraram ter atividade aumentada, para formar combinações de anticorpos, ou porções ligadoras de antígenos; e

15 g) avaliando a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígenos dos mesmos com dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada, relativos para o anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

20 até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade aumentada, reativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é obtido.

Preferivelmente, o resíduo aminoácido de atividade aumentada substitui resíduos aminoácidos localizados em posições selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96.

25 Seguindo a mutagênese de posições individuais selecionadas, clones mutados podem ser sequenciados para identificar quais resíduos aminoácidos têm sido introduzidos na posição selecionada em cada clone. Um número pequeno de clones (por exemplo, cerca de 24) pode ser selecionado para sequenciamento, que estatisticamente devem produzir 10-15 anticorpos únicos, em bora números maiores de clones (por exemplo, maior que 60) podem ser sequenciados para garantir que anticorpos com cada substituição possível na posição selecionada são identificados.

35 Em uma modalidade, posições de contato e/ou hipermutação dentro das regiões CDR3 das cadeias pesada e/ou leve são primeiro selecionadas para mutagênese. Entretanto, para anticorpos que tenham já sido maturados para afinidade in vitro por mutagênese aleatória das regiões CDR3 através da seleção que revela fago, eles podem preferivelmente primeiro selecionar posições de contato e/ou hipermutação dentro do CDR1 e CDR2 da cadeia pesada e/ou leve.

Em uma modalidade mais preferida, posições de mutagênese seletivas preferidas dentro das regiões CDR3 das cadeias pesada e/ou leve são primeiro selecionadas para mutagênese. Entretanto, para anticorpos que tenham já sido maturados para afinidade in vitro por mutagênese aleatória das regiões CDR3 através da seleção que revela fago, eles podem preferivelmente primeiro selecionar posições de mutagênese seletiva dentro do CDR1 e CDR2 da cadeia pesada e/ou leve.

Em outra modalidade preferida, a otimização de um anticorpo selecionado pela abordagem de mutagênese seletiva é feita sequencialmente como segue: posições de mutagênese seletiva preferida a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 são mutados primeiro em pelo menos 2 outros aminoácidos cada (preferivelmente 5-14 outros aminoácidos) e os anticorpos resultantes são caracterizados para afinidade aumentada, potência de neutralização (e possivelmente também por pelo menos outra característica retida ou propriedade discutida em outro lugar). Se uma mutação de uma posição de mutagênese seletiva preferida única não aumenta a afinidade ou potência de neutralização em todos ou suficientemente e se mesmo a combinação de múltiplos aminoácidos de atividade aumentada substituindo aminoácidos nas posições de mutagênese seletivas preferidas não resulta em uma combinação de anticorpo que encontra a atividade alvo (incluindo afinidade e/ou potências de neutralização), resíduos aminoácidos adicionais serão selecionados para mutagênese seletiva a partir do grupo consistindo de H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A e L96 são mutados para pelo menos outros aminoácidos cada (preferivelmente 5-14 outros aminoácidos) e os anticorpos resultantes são caracterizados para afinidade aumentada, potência de neutralização (e possivelmente também para pelo menos outra característica retida ou propriedade discutida em outro lugar).

Se a mutação de um resíduo aminoácido único selecionado a partir do grupo consistindo de H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A e L96 não aumenta a atividade (incluindo afinidade e/ou potências de neutralização) total ou não suficientemente e se mesmo a combinação de aminoácidos de atividade aumentada múltipla substituindo aminoácidos naquelas posições não resulta em um anticorpo de combinação que encontra a atividade alvo (incluindo afinidade e/ou potência de neutralização do alvo), resíduos aminoácidos adicionais serão selecionados para mutagênese seletiva a partir do grupo consistindo de H33B, H52B, L31A e são mutados em pelo menos 2 outros aminoácidos cada (preferivelmente 5-14 outros aminoácidos) e os anticorpos resultantes são caracterizados para afinidade aumentada, potência de neutralização (e possivelmente também para pelo menos uma outra característica retida ou propriedade discutida em outro lugar).

Deve ser entendido que a abordagem de mutagênese seletiva sequencial pode terminar em quaisquer dos passos ressaltados acima tão logo o anticorpo com a atividade

desejada (incluindo afinidade e potência de neutralização) tenha sido identificado. Se mutagênese das posições pré-selecionadas tece resíduos aminoácidos de atividade aumentada identificados, mas a combinação de anticorpo ainda não encontra o alvo selecionado para atividade (incluindo afinidade e potência de neutralização) e/ou se aminoácidos de atividade aumentada identificados também afetam outras características desejadas e são assim não aceitáveis, os resíduos CDR remanescentes podem ser sujeitadas à mutagênese (ver seção IV).

O método da invenção pode ser utilizado para aumentar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para alcançar uma atividade alvo pré-determinada (por exemplo, uma afinidade pré-determinada e/ou potência de neutralização, e/ou uma propriedade desejada ou característica).

Conseqüentemente, a invenção provê um método de melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para ater uma atividade alvo pré-determinada, compreendendo:

- a) prover um anticorpo parente, uma porção ligadora de antígeno do mesmo;
- b) selecionar uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L50, L91, L92, L93, L94;
- c) mutação individual da posição de mutagênese seletiva preferida selecionada para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um primeiro painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo;
- d) avaliar a atividade do primeiro painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo para determinar se a mutação de uma posição de mutagênese seletiva única produz um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo com a atividade alvo pré-determinada ou uma atividade alvo parcial;
- e) combinando em uma maneira gradativa, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutações individuais mostraram ter atividade melhorada, para formar combinações de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo.
- f) avaliar a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, para determinar se a combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos têm a atividade alvo pré-determinada ou atividade alvo parcial.
- g) se passos d) ou f) não resultarem em um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo tendo a atividade alvo pré-determinada, ou resulta em anticorpo com somente uma atividade parcial, resíduos aminoácidos adicionais selecionados a partir do grupo consistindo de H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A e L96 são mutados para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos assim criando um segundo painel de anticorpos mutados ou porções ligadoras de antígenos do mesmo;



h) avaliar a atividade do segundo painel de anticorpos mutados ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, para determinar se mutação de um resíduo aminoácido único selecionado a partir do grupo consistindo de H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A e L96 resulta em um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, tendo uma  
5 atividade alvo pré-determinada ou atividade parcial;

i) combinando de forma gradativamente no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutações individuais do passo g) mostraram ter uma atividade aumentada, para formar combinações de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

j) avaliar a atividade da combinação de anticorpos ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, para determinar se a combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo têm a atividade alvo pré-determinada ou uma atividade alvo parcial;

k) se passos h) ou j) não resultaram em um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo tendo a atividade alvo pré-determinada, ou resultar em um anticorpo com somente uma atividade parcial, resíduos aminoácidos adicionais selecionadas a partir do grupo consistindo de H33B, H52B e L31A são mutados para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos assim criando um terceiro painel de anticorpos mutados ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos;

l) avaliar a atividade do terceiro painel de anticorpos mutados ou porções de ligação de antígeno do mesmo, para determinar se uma mutação de um resíduo aminoácido único selecionado a partir do grupo consistindo de H33B, H52B e L31A resultando em um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, tendo a atividade alvo pré-determinada ou atividade parcial;

m) combinando em uma maneira gradativa no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutação individual do passo k) mostrou ter uma atividade aumentada, para formar combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

n) avaliar a atividade da combinação dos anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, para determinar se a combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo tem a atividade alvo pré-determinada para assim produzir um anticorpo ou porção ligadora de antígeno com uma atividade alvo pré-determinada.

Um número de métodos de mutagenese pode ser utilizado, incluindo a união PCR, Kunkel (dut-ung-) e mutagenese direcionada a oligonucleotídeo tiofosfato (kit Amersham Sculptor).

Uma grande variedade de sistemas de expressão hospedeiros pode ser utilizada para expressar anticorpos mutados, incluindo sistemas de expressão bacterianos, levedura, baculoviral e mamífero (bem como sistemas de expressão que revela fago). Um exemplo de um vetor de expressão bacteriano adequado é pUC110(Sfi). Outros sistemas de expressão de anticorpo são conhecidos na técnica e/ou são descritos abaixo na seção IV.

Os anticorpos modificados, ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, produzidos pelo método da invenção podem ser identificados sem a confiança nos métodos que revelam fago para seleção. Consequentemente, o método da invenção é particularmente vantajoso para melhorar a atividade de um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que foi obtida por seleção em um sistema que revela fago, mas cuja atividade não pode ainda melhorar por mutagênese no sistema que revela fago.

Consequentemente, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a afinidade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) prover um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido por seleção em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar uma posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região de determinação de complementariedade (CDR) para mutação, assim identificando um contato selecionado ou posição de hipermutação;

c) mutação individual referida selecionada da posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, e expressando o referido painel em um sistema que revela fago;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo para anticorpo parente ou porção ligadora ao antígeno do mesmo;

e) opcionalmente repetindo passos b) a d) por pelo menos outra posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

f) combinar, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, mutações individuais mostradas terem atividade melhorada, para formar combinação de anticorpo, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo; e

g) avaliar a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno, relativa ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo; até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade aumentada, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é obtido.

Posições de contato preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96. Posições de hipermutação preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 e L93. Posições de mutagênese seletiva mais preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52,

H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93 e L94. Posições de contato particularmente preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94.

Com métodos disponíveis não é possível ou é extremamente trabalhoso derivar um anticorpo com afinidade ligadora aumentada e potência de neutralização enquanto retém outras propriedades ou características dos anticorpos como discutido acima. O método desta invenção, entretanto, pode facilmente identificar tais anticorpos. Os anticorpos sujeitos ao método desta invenção podem vir de qualquer fonte.

Assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

10 a) prover um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

b) selecionar uma posição mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região determinando de complementariedade (CDR) para mutação, assim identificando uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada, posição de contato ou hipermutação;

c) mutação individual referida selecionou posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressando o referido painel em um sistema de expressão apropriado;

20 d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

e) avaliar o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativos ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo para pelo menos outra propriedade ou características, em que a propriedade ou característica é uma que precisa ser retida no anticorpo;

até um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é obtido.

30 Em uma modalidade preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96 e outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em outra modalidade preferida, as posições de hipermutação são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 e L93 e outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítopo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida os resíduos para mutagênese são selecionados a partir das posições de mutagênese seletivas preferidas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 e outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítopo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94 e outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítopo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Se dessa forma, a afinidade de um anticorpo para um antígeno específico deve ser melhorada, mas onde a método revela o fago (ou sistema relacionado incluindo revelação de ribossomo) não é mais aplicável, e outras propriedades desejáveis ou características podem ser retidas, o método da invenção pode ser utilizado. Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) provendo um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar uma posição mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região determinando de complementariedade (CDR) para mutação, assim identificando uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada, posição de contato ou hipermutação;

c) mutação individual referida selecionou posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos pa-

ra assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressando o referido painel em um sistema de expressão apropriado;

5 d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

10 e) avaliar o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativos ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo para pelo menos outra propriedade ou características, em que a propriedade ou característica é uma que precisa ser retida, até um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtida.

f) opcionalmente, repetir passos a) a e) por pelo menos uma outra posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

15 g) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada individual mostrando ter atividade aumentada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, para formar combinação de anticorpos, ou porções de ligação de antígeno do mesmo; e

20 h) avaliar a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, relativa ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo; até um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma retida outra propriedade ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtida.

25 Em uma modalidade preferida, as posições de contato são selecionados a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96 outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

35 Em outra modalidade preferida, as posições de hipermutação são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53, e L93 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida os resíduos para mutagênese seletiva são selecionados a partir de posições de mutagênese preferidas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) provendo um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar uma posição mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região determinando de complementariedade (CDR) para mutação, assim identificando uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada, posição de contato ou hipermutação;

c) mutação individual referida selecionou posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressando o referido painel em um sistema de expressão apropriado;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

e) avaliar o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativos ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo para pelo menos outra propriedade ou características, em que a propriedade ou característica é uma que precisa ser retida, até um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtida.

Em uma modalidade preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96 outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em outra modalidade preferida, as posições de hipermutação são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53, e L93 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida os resíduos para mutagênese seletiva são selecionados a partir de posições de mutagênese preferidas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em uma modalidade mais preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) provendo um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar uma posição mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação dentro de uma região determinando de complementariedade (CDR) para muta-

ção, assim identificando uma posição de mutagênese seletiva preferida selecionada, posição de contato ou hipermutação;

c) mutação individual referida selecionou posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressando o referido painel em um sistema de expressão apropriado;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

e) avaliar o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativos ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo para pelo menos outra propriedade ou características, em que a propriedade ou característica é uma que precisa ser retida, até um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtida.

f) opcionalmente, repetir passos a) a e) por pelo menos outra posição de mutagênese seletiva preferida, posição de contato ou hipermutação;

g) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada individual mostrando ter atividade aumentada e pelo menos uma propriedade retida ou característica, para formar combinação de anticorpos, ou porções de ligação de antígeno do mesmo; e

h) avaliar a atividade da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, relativa ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo; até um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos uma retida outra propriedade ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtida.

Em uma modalidade preferida, as posições de contato são selecionados a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96 outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Em outra modalidade preferida, as posições de hipermutação são selecionadas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53, e L93 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cru-



zada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

5 Em uma modalidade mais preferida os resíduos para mutagênese seletiva são selecionados a partir de posições de mutagênese preferidas a partir do grupo consistindo de H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

10 Em uma modalidade mais preferida, as posições de contato são selecionadas a partir do grupo consistindo de L50 e L94 e a outra característica é selecionada a partir de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

#### 20 IV. Modificações de outros resíduos CDR

Ultimamente, todos os resíduos CDR no dado par antígeno-anticorpo identificado por qualquer meio ser requerido como resíduo aminoácido de atividade aumentada e/ou requerido diretamente ou indiretamente para aligar ao antígeno e/ou reter outras propriedades desejáveis ou características do anticorpo. Tais resíduos CDR são referidos como “posições de mutagênese seletivas preferidas”. Deve ser notado que em circunstâncias específicas que resíduos de mutagênese seletiva preferidos podem ser identificados também por outros meios incluindo co-cristalização do anticorpo e antígeno e modelagem molecular.

30 Se as tentativas preferidas para identificar aminoácidos de atividade aumentada focando nas posições de mutagênese seletiva preferida, posições de contato ou hipermutação descritas acima são exaustos, ou se melhoramentos adicionais são requeridos, os resíduos CDR remanescentes podem ser modificados como descrito abaixo. Deve ser entendido que o anticorpo deve já estar modificado em qualquer uma ou mais posições de hipermutação de acordo com as modalidades discutidas acima mas podem requerer melhoramentos adicionais. Assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

- a) prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;
- b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de com-

plementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

5 c) mutação individual referida selecionou posição, por exemplo, para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um anticorpo mutado ou um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

10 e) avaliar o anticorpo mutado ou o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativos ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo para mudanças em pelo menos outra propriedade ou características até um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtida.

15 Preferivelmente, a outra característica ou propriedade é selecionada de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

20 Se mutagênese de um resíduo único não é suficiente, outros resíduos podem ser inclusos; assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, compreendendo:

25 a)prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

30 c) mutação individual referida selecionou posição, por exemplo, para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

35 e) repetindo passos b) a d) por pelo menos uma outra posição CDR que é nem a posição selecionada sob b) nem a posição a H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52,

H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

f) combinando, em anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada individual mostrando ter  
5 atividade melhorada, para formar combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno; e

g) avaliar a atividade da combinação dos anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo com dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada, reativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade aumentada, relativa ao anticorpo parente,  
10 ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtido.

Se tentativas preferidas para identificar a atividade de aminoácidos de atividade aumentada focando nas posições de contato ou hipermutação descrito acima são exaustos, ou se melhoramentos adicionais são requeridos, e o anticorpo em questão pode não mais ser otimizado por mutagênese e métodos que revelam o fago (ou relacionados a revelação de ribossomo) a permanência de resíduos CDR pode ser modificada como descrito abaixo. Deve ser entendido que o anticorpo pode já ser modificado em qualquer uma ou mais posições de mutagênese seletiva preferida, posições de contato ou hipermutação de acordo com as modalidades discutidas acima, mas podem requer melhoramentos adicionais.

20 Assim em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

a) provendo um anticorpo parente recombinante ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido por seleção em um sistema que revela fago mas aquela atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema de revelação de fago;

25 b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e;

30 c) mutação individual referida selecionou posição de contanto ou hipermutação para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, e expressando o referido painel em um sistema de revelação não fago;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

35 e) avaliando o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para mu-

danças em pelo menos uma outra propriedade ou característica, até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtido.

Preferivelmente, a outra característica ou propriedade é selecionada de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

10 Se uma mutagênese única não é suficiente para aumentar a afinidade do anticorpo outros resíduos podem ser inclusos na mutagênese. Assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para aumentar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

15 a) provendo um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo; que foi obtido por seleção em um sistema que revela fago mas aquela atividade não pode ser ainda melhorada por mutagênese no referido sistema de revelação de fago;

20 b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

c) mutação individual referida selecionou posição para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, e expressando o referido painel em um sistema de revelação não fago;

25 d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

30 e) repetindo passos b) a d) por pelo menos uma ou outra posição não é nem a posição selecionada sob b) nem uma posição a H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94;

35 g) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada individual mostrou ter atividade melhorada, formar combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo; e

h) avaliar a atividade e outra propriedade ou característica da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo com dois resíduos aminoácidos de ati-

vidade aumentada, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de anticorpo do mesmo; até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada, relativo ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtido.

Preferivelmente, a outra característica ou propriedade é selecionada de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítopo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

A tentativa preferida de identificar aminoácidos de atividade aumentada focando nas posições de mutagênese seletiva preferida, posições de contato ou hipermutação descrita pode ser exausta, ou melhoramentos adicionais podem ser requeridos, e eles são importantes para reter outras propriedades ou características do anticorpo.

Assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, sem afetar outras características, compreendendo:

a) prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;

b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

c) mutação individual referida selecionou posição para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

e) avaliando o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para mudanças em pelo menos uma outra propriedade ou característica, até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, seja obtido.

Preferivelmente, a outra característica ou propriedade é selecionada de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítopo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítopo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germina-

tiva.

Se mutagênese de um resíduo único não é suficiente, outros resíduos podem ser inclusos; assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

- 5 a) prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo;
- b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;
- 10 c) mutação individual referida selecionou posição para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo;
- d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;
- 15 e) avaliando o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para mudanças em pelo menos uma outra característica ou propriedade;
- e) repetindo passos b) a e) por pelo menos uma outra posição CDR que não é a
- 20 posição selecionada sob b) nem uma posição a H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;
- f) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada mostrou ter atividade mel-
- 25 hroadada e não afeta pelo menos um outra propriedade ou característica, para formar a combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno; e
- g) avaliando a atividade e a retenção de pelo menos uma outra propriedade ou característica da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo com dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada, relativo ao anticorpo parente ou
- 30 porção ligadora de antígeno do mesmo até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos um reteve outra propriedade ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtido.

Mutagênese da posição de mutagênese seletiva preferida, resíduos de contato e

35 hipermutação podem não ter aumentado a afinidade do anticorpo suficientemente, e mutagênese e o método que revela fago (ou relacionado ao método que revela o ribossomo) pode não mais ser útil e pelo menos uma outra característica ou propriedade do anticorpo deve

ser retida.

Assim em outra modalidade a invenção provê um método para melhorar a afinidade de um anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, compreendendo:

5 a)prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo que foi obtido por seleção em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser adicionalmente melhorado por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52,  
10 L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

c) mutação individual referida selecionou posição para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressão em um sistema que revela não fago;

d) avaliar a atividade do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

e) avaliando o painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para mudanças em pelo menos outra propriedade ou característica até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada, relativa ao anticorpo parente,  
20 ou porção ligadora de antígeno, ser obtido.

Preferivelmente, a outra característica ou propriedade é selecionada de 1) preservação da não reatividade cruzada com outras proteínas ou tecidos humanos, 2) preservação do epítipo de reconhecimento, isto é, reconhecendo epítipo p40 preferivelmente no contexto do heterodímero p70 p40/p35 prevenindo a interferência de ligação da p40 livre solúvel e/ou 3) produzir um anticorpo com uma sequência próxima à imunoglobulina linha germinativa.

Se mutagênese de um resíduo único não é suficiente, outros resíduos podem ser inclusos; assim, em outra modalidade, a invenção provê um método para melhorar a atividade de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, compreendendo:

a)prover um anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo que foi obtido por seleção em um sistema que revela fago mas cuja atividade não pode ser adicionalmente melhorado por mutagênese no referido sistema que revela fago;

b) selecionar um resíduo aminoácido dentro de uma região determinante de complementariedade (CDR) para mutação outro que H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52,  
35 L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

c) mutação individual referida selecionou posição para pelo menos dois outros resíduos aminoácidos para assim criar um painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo e expressão em um sistema que revela não fago;

5 d) avaliar a atividade e retenção de pelo menos uma outra propriedade ou características do painel de anticorpos mutados, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim identificando um resíduo aminoácido de atividade aumentada;

10 e) repetindo passos b) a d) por pelo menos uma outra posição CDR que não é a posição selecionada sob b) nem uma posição a H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 e L96;

15 f) combinando, no anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pelo menos dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada mostrou ter atividade melhorada e não afeta pelo menos um outra propriedade ou característica, para formar a combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígeno; e

20 g) avaliando a atividade e a retenção de pelo menos uma outra propriedade ou característica da combinação de anticorpos, ou porções ligadoras de antígenos do mesmo com dois resíduos aminoácidos de atividade aumentada, relativo ao anticorpo parente ou porção ligadora de antígeno do mesmo até um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, com uma atividade melhorada e pelo menos um reteve outra propriedade ou característica, relativa ao anticorpo parente, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, ser obtido.

#### V. Expressão de Anticorpos

25 Um anticorpo, ou porção do anticorpo, da invenção pode ser preparado por expressão recombinante de genes de cadeia leve e pesada da imunoglobulina em uma células hospedeira. Para expressar um anticorpo recombinantemente, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores de expressão recombinante carreando fragmentos de DNA codificando as cadeias leves e pesadas da imunoglobulina do anticorpo tal que as cadeias leve e pesada são expressas na célula hospedeira e, preferivelmente, secretado no  
30 meio em que as células hospedeiras são cultivadas, a partir de tal meio os anticorpos podem ser recuperados. Metodologias de DNA recombinante padrão são utilizadas para obter genes de cadeia pesada e leve de anticorpo, incorporando esses genes em vetore de expressão recombinante e introduzindo os vetores em células hospedeiras, tal como aquelas descritas em Sambrook, Fritsch e Maniatis (eds), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,  
35 Segunda Edição, Cold Spring Harbor, NI (1989), Ausubel, F. M. *et al* (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1989) e na Patente dos EUA No. 4.816.397 por Boss *et al*.



Para obter um fragmento de DNA codificando a região variável de cadeia pesada do Joe 9 wt ou um anticorpo relacionado a Joe 9 wt, anticorpos específicos para IL-12 humano foram selecionados partir de bibliotecas humanas e mutadas, como descrito na seção II. Uma vez que fragmentos de DNA codificando Joe 9 wt ou segmentos VP e VL relacionado a Joe 9 wt são obtidos, mutagênese dessas sequências é realizada por métodos padrões, tal como mutagênese direcionada para o sítio PCR (mutagênese mediada por PCR em que os nucleotídeos mutados são incorporados nos iniciadores PCR tal que o produto PCR contém as mutações) ou métodos de mutagênese direcionada para o sítio. Anticorpos IL-12 humanos que revelam um nível de atividade e especificidade/efinidade de ligação que foi desejável, por exemplo, J695, foram ainda manipulados por técnicas de DNA recombinantes padrão, por exemplo, para converter os genes da região variável para genes de cadeia de anticorpo de comprimento inteiro, para genes de fragmento de Fab ou para um gene scFv. Nessas manipulações, o fragmento de DNA codificando VL e VP é operativamente ligado a outro fragmento de DNA codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo “ligado operativamente”, como utilizado neste contexto, é tencionado significar que dois fragmentos de DNA são unidos tal que as sequências aminoácida codificadas pelos dois fragmentos de DNA permanecem estruturados.

O DNA isolado codificando a região VP pode ser convertido para um gene de cadeia pesada de comprimento inteiro por operativamente ligar o DNA codificando a VP à outra molécula de DNA codificando regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As sequências dos genes de região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Kabat, E.A., *et al*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH, No. 91-3242) e fragmentos de DNA compreendendo essas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD e qualquer variante alotípica da mesma como descrito em Kabat (Kabat, E.A. *et al* (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH, No. 91-3242), mas mais preferivelmente é uma região constante de IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada do fragmento Fab, o DNA codificando VP pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA codificando somente a região constante de CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado codificando a região VL pode ser convertida a um gene de cadeia leve de comprimento inteiro (bem como um gene de cadeia leve Fab) por operativamente ligando o DNA codificando VL para outra molécula DNA codificando a região constante de cadeia leve, CL. As sequências de genes de região constante de cadeia leve humana são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Kabat, E.A., *et al*, (1991) Sequences of Proteins of

Immunological Interest, Quinta Edição, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Publicação NIH, No. 91-3242) e fragmentos DNA compreendendo essas regiões podem ser obtidas por amplificação por PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda, mas mais preferivelmente é uma região constante lambda.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA codificando VP e VL são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligador flexível, por exemplo, codificando a sequência aminoácida (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, tal que as sequências VP e VL podem ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões VL e VP juntas por um ligador flexível (ver, por exemplo, Bird *et al* (1988) Science 242: 423-426; Huston *et al* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883; McCafferty *et al*, Nature (1990) 348:552-554).

Para expressar os anticorpos, ou porções de anticorpos da invenção, DNAs codificando cadeias leves ou pesadas de comprimento inteiro ou parcial, obtidos como descrito acima, são inseridos em vetores de expressão tal que os genes são operativamente ligados às sequências transcricional e traducional. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" é tencionado significar que um gene de anticorpo está ligado em um vetor tal que sequências de controle de transcrição e tradução dentro do vetor serve sua função tencionada de regular a transcrição e tradução do gene do anticorpo. O vetor de expressão e sequências controle de expressão são escolhidos serem compatíveis com a expressão da célula hospedeira utilizada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos no vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementar no fragmento do gene do anticorpo e vetor, ou ligação a extremidade cega se nenhuma restrição está presentes). Antes da inserção das sequências de cadeia leve e pesado J695 ou relacionado a J695, o vetor de expressão podem já carrear sequências da região constante. Por exemplo, uma abordagem converte sequências Vp e VL de J695 ou relacionado ao J695 para genes do anticorpo de comprimento inteiro é para inserir os mesmos nos vetores de expressão já codificando as regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve, respectivamente, tal que o segmento VP é operativamente ligado ao(s) segmento(s) CP dentro do vetor e o segmento VL é operativamente ligado ao(s) segmento (s) CP dentro do vetor e o segmento VL é operativamente ligado ao segmento CL dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um sinal peptídeo que facilita a secreção da cadeia do anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor tal que o peptídeo sinal está ligado pela estrutura ao amino terminal do gene da cadeia do anticorpo. O sinal peptídico pode ser um peptídeo sinal da imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (isto é, um peptídeo sinal a partir de uma

proteína não imunoglobulina).

Em adição aos genes de cadeia do anticorpo, os vetores de expressão recombinante da invenção carregam as sequências regulatórias que controlam a expressão dos genes da cadeia do anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "sequência regulatória" é tencio-

5 nado incluir promotores, aumentadores e outros elementos que controlam a expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou tradução dos genes da cadeia do anticorpo. Tais sequências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, São Diego, CA (1990). Será apreciado pelos versados na técnica que o desenho do vetor de expressão,

10 incluindo a seleção das sequências regulatórias pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada etc. Sequências regulatórias preferidas para expressão na célula hospedeira mamífera incluem elementos virais que direcionam altos níveis da expressão proteica em células mamíferas, tais como promotores e/ou aumentadores derivados de citomegalovírus (CMV) (tal como o

15 promotor/aumentador CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/aumentador SV40), adenovírus (por exemplo, promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e polio-

ma. Para descrição adicional dos elementos regulatórios virais, e sequências dos mesmos, ver, por exemplo, Patente dos EUA No. 5.168.062 por Stinski. Patente dos EUA No. 4.510.245 por Bell *et al*, e Patente dos EUA No. 4.968.615 por Schaffner *et al*, Patente dos

20 EUA No. 5.464.758 por Bujard *et al*, e Patente dos EUA No. 5.654.168 por Bujard *et al*.

Em adição aos genes de cadeia do anticorpo e sequências regulatórias, os vetores de expressão recombinante da invenção podem carrear sequências adicionais, tais como sequências que regulam replicação do vetor em células do hospedeira (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a

25 seleção das células hospedeiras em que o vetor tem sido introduzido (ver, por exemplo, Patentes dos EUA Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todos por Axel *et al*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência às drogas, tal como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira em que o vetor tem sido introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene diidrofolato reductase (DHFR)

30 (para uso nas células hospedeiras dhfr- com seleção/amplificação com metotrexato) e o gene neo (para seleção G418).

Para expressão das cadeias leve e pesada, o(s) vetor(s) de expressão(s) codificando as cadeias pesada e leve é transfetado em uma célula hospedeira por técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" são tencionadas compreender uma grande variedade de técnicas comumente utilizadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula

35 hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação cálcio-fosfato, transfecção DEAD-dextrano e semelhantes. Embora é teoricamente possível ex-

pressar os anticorpos da invenção em ou células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, expressão de anticorpos em células eucarióticas, e mais preferivelmente células hospedeiras mamíferas, é mais preferida porque tais células eucarióticas, e em particular células mamíferas, é mais provável que as células procarióticas para unir e secretar um anticorpo dobrado propriamente e imunologicamente ativo. Células hospedeiras mamíferas preferidas por expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descrito em Urlaub e Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77:4216-4220), utilizado com um marcador selecionável DHFR, por exemplo, como descrito em R.J. Kaufman e P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS e células SP2. Quando vetores de expressão recombinante são produzidos pela cultura das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são crescidas. Anticorpos podem ser recuperados a partir de meio de cultura utilizando métodos de purificação da proteína padrão.

Células hospedeiras podem também ser utilizadas para produzir porções de anticorpos intactos, tais como fragmentos Fab ou moléculas scFv. Será entendido que variações no procedimento acima estão dentro do objetivo da presente invenção. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com DNA codificando ou a cadeia leve ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo desta invenção. Tecnologia de DNA recombinante pode também ser utilizada para remover algum ou todo DNA codificando uma ou ambas as cadeias leve e pesada que não é necessária para ligar a hIL-12. As moléculas expressas a partir de tais moléculas de DNA truncado são também compreendidas pelos anticorpos da invenção. Em adição, anticorpos bifuncionais podem ser produzidos em que uma cadeia pesada e uma leve são um anticorpo da invenção e outra cadeia pesada e leve são específicas para um antígeno outro que hIL-12 por ligação cruzada de um anticorpo da invenção para um segundo anticorpo por métodos de ligação cruzada química padrão.

Em um sistema preferido para expressão recombinante de um anticorpo, ou porção ligadora do antígeno do mesmo, da invenção, um vetor de expressão recombinante codificando ambos, a cadeia pesada do anticorpo e a cadeia leve do anticorpo é introduzida nas células dhfr-CHO por transfecção mediada por fosfato de cálcio. Dentro do vetor de expressão recombinante, os genes de cadeia pesada e leve do anticorpo são cada operacionalmente ligados aos elementos aumentadores/promotores regulatórios (por exemplo, derivado a partir de SV40, CMV, adenovírus e semelhantes, tal como um aumentador CMV/elemento regulatório promotor AdMLP ou um aumentador SV40/elemento regulatório promotor AdMLP) para dirigir níveis altos de transcrição dos genes. O vetor de expressão recombinante também carrega um gene DHFR, que permite para a seleção das células CHO que têm sido

transfectado com o vetor utilizando seleção/amplificação metotrexato. As células hospedeiras transformantes selecionadas são cultivadas para permitir a expressão de cadeias pesada e leve do anticorpo e anticorpo intacto é recuperado a partir do meio de cultura. Técnicas de biologia molecular padrão são utilizadas para preparar a vetor de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, selecionar para transformantes, cultura de células hospedeiras e recuperação do anticorpo a partir do meio de cultura. Anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo da invenção podem ser expressos em um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes da imunoglobulina humana (ver, por exemplo, Taylor, LD *et al* (1992) Nucl. Acids. Res. 20:6287-6295). Células de planta podem também ser modificadas para criar plantas transgênicas que expressam o anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo, da invenção.

Em vista do antecedente, outro aspecto da invenção pertence ao ácido nucléico, vetor e composições de célula hospedeira que pode ser usado para expressão recombinante dos anticorpos e porções do anticorpo da invenção. Preferivelmente, a invenção retrata ácidos nucléicos isolados que codificam CDRs de J695, ou a região variável da cadeia pesada e/ou leve inteira de J695. Consequentemente, em uma modalidade, a invenção retrata um ácido nucléico variável codificando uma região variável de cadeia pesada do anticorpo que codifica o CDR3 de cadeia pesada J695 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:25. Preferivelmente, o ácido nucléico codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo ainda codifica uma cadeia pesada J695 CDR2 que compreende a sequência aminoácida da SEQ ID NO:27. Mais preferivelmente, o ácido nucléico codificando a região variável de cadeia pesada do anticorpo ainda codifica uma cadeia pesada J695 CDR1 que compreende a sequência aminoácida da SEQ ID NO:29. Ainda mais preferivelmente, o ácido nucléico codifica uma região variável de cadeia pesada do anticorpo compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:31 (a região VP inteira do J695).

Em outras modalidades, a invenção retrata um ácido nucléico isolado codificando uma região variável de cadeia leve do anticorpo que codifica a cadeia leve H695 CDR3 compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:26. Preferivelmente, o ácido nucléico codificando a região variável de cadeia leve do anticorpo ainda codifica uma cadeia leve J695 CDR2 que compreende a sequência aminoácida da SEQ ID NO:28. Mais preferivelmente, o ácido nucléico codificando a região variável de cadeia leve do anticorpo ainda codifica uma cadeia leve J695 CDR1 que compreende a sequência aminoácida da SEQ ID NO:30. Ainda mais preferível, o ácido nucléico isolado codifica uma região variável de cadeia leve do anticorpo compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:32 (a região VL inteira do J695).

A invenção também provê vetores de expressão recombinante codificando ambos, uma cadeia pesada de anticorpo e uma cadeia leve de anticorpo. Por exemplo, em uma

modalidade, a invenção provê um vetor de expressão recombinante codificando:

a) uma cadeia pesada de anticorpo tendo uma região variável compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:31; e

5 b) uma cadeia leve do anticorpo tendo uma região variável compreendendo a sequência aminoácida da SEQ ID NO:32.

A invenção também provê células hospedeiras nas quais um ou mais dos vetores de expressão recombinante da invenção têm sido introduzidos. Preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula hospedeira mamífera, mais preferivelmente a célula hospedeira é uma célula CHO, uma célula NS0 ou uma célula COS. Ainda adicionalmente a invenção  
10 provê um método de sintetizar um anticorpo humano recombinante da invenção por cultivar uma célula hospedeira da invenção em um meio de cultura adequado até um anticorpo humano recombinante da invenção é sintetizado. O método pode ainda compreender isolar o anticorpo humano recombinante a partir do meio de cultura.

#### VI. Composições Farmacêuticas e Administração Farmacêutica

15 Os anticorpos e porções do anticorpo da invenção podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração a um paciente. Tipicamente, a composição farmacêutica adequada para administração a um paciente. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável. Como utilizado, "veículo farmacêuticamente acei-  
20 tável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de atraso de absorção, e semelhantes que são compatíveis fisiologicamente. Exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem um ou mais de água, salina, salina tamponada por fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como composições dos mesmos. Em muitos casos, será preferível incluir  
25 agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Veículos farmacêuticamente aceitáveis podem ainda compreender quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes umidificantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que aumentam a meia de vida de estocagem ou efetividade do anticorpo ou porção do anticorpo.

30 Os anticorpos e porções de anticorpo da invenção podem ser incorporados em uma composição farmacêutica adequada para administração parental. Preferivelmente, o anticorpo ou porções do anticorpo estarão preparados como uma solução injetável contendo 0,1-250 mg/mL do anticorpo. A solução injetável pode ser composta de ou um líquido ou uma forma de dosagem liofilizada em um sílex ou frasco âmbar, ampola ou seringa pré-  
35 enchida. O tampão pode ser L-histidina (1-50 mM), otimamente 5-10 mM no pH 5,0 a 7,0 (otimamente pH 6,0). Outros tampões adequados incluem, mas não são limitados a succinato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio ou fosfato de potássio. Cloreto de sódio pode

ser utilizado para modificar a toxicidade da solução em uma concentração de 0-300 mM (otimamente 150 mM para uma forma de dosagem líquida). Crioprotetores podem ser inclusos para uma forma de dosagem liofilizada, principalmente 0-10% de sacarose (otimamente 0,5-1,0%). Outros crioprotetores adequados incluem trealose e lactose, Agentes espessantes podem ser inclusos para uma forma de dosagem liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (otimamente 2-4%). Estabilizadores podem ser utilizados em ambas as formas de dosagem líquida e liofilizadas, principalmente 1-50 mM de L-Metionina (otimamente 5-10 mM). Outros agentes espessantes adequados incluem glicina, arginina, podem ser inclusos como 0-0,05% de polisorbato-80 (otimamente 0,005-0,01%). Tensoativos adicionais incluem mas não são limitados para polisorbato 20 e tensoativos BRIJ.

Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica inclui o anticorpo em uma dose de cerca de 100 mg – 200 mg de dose.

As composições desta invenção podem ser feitas em uma variedade de formas. Esses incluem, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo tencioado da administração e aplicação terapêutica. Composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou infundíveis, tais como composições similares para aqueles utilizados para imunização passiva de humanos com outros anticorpos. O modo preferido de administração é parental (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é administrado por injeção subcutânea.

Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e estocagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossomo, ou outras estruturas ordenadas adequadas para alta concentração da droga. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo (isto é, anticorpo ou porção do anticorpo) na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido por esterilização por filtração. Geralmente, dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e requer outros ingredientes a partir desses enumerados acima. No caso de pós estéreis liofilizados para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos da preparação são secagem a vácuo e secagem por pulverização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução estéril filtrada previamente da mesma. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerida no caso da dispersão e pelo uso de tensoativos. Absor-

ção prolongada de composições injetáveis pode ser trazida por incluir na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais monoestearato e gelatina.

Os anticorpos e porções de anticorpos da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via preferida/modo de administração é injeção subcutânea, injeção intravenosa ou infusão. Bem como ser apreciada pelo versado na técnica, a via e/ou modo de administração variará dependendo sob resultados desejados. Em certas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um veículo que protegerá o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos, e sistemas de distribuição microencapsulados. Biodegradáveis, polímeros biocompatíveis podem ser utilizados, tais como acetato de vinila, polianidretos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoéster, e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos pelos versados na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Em certas modalidades, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser oralmente administrado, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) pode também ser colocado em uma cápsula de gelatina dura ou mole, compressa em comprimidos, ou incorporada diretamente na dieta dos pacientes. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e utilizados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias e semelhantes. Para administrar um composto da invenção por outra administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrado o composto com, um material para prevenir sua inativação.

Compostos suplementares ativos podem também ser incorporados nas composições. Em certas modalidades, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais que são úteis para tratar distúrbios em que a atividade de IL-12 está em detrimento. Por exemplo, um anticorpo anti-hIL-12 ou porção do anticorpo da invenção pode ser co-formulado e/ou co-administrado com um ou mais anticorpos adicionais que se ligam a outros alvos (por exemplo, anticorpos que se ligam a outras citocinas ou que se ligam a moléculas de superfície celular). Além disso, um ou mais anticorpos da invenção pode ser utilizados em combinação com dois ou mais dos antecedentes agentes terapêuticos. Tais terapias de combinação podem vantajosamente utilizar doses menores de agentes terapêuticos administrados, então evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias. Será apreciado pelo versado na técnica que quando os anticorpos da invenção são



utilizados como parte de uma terapia de combinação, uma dose menor do anticorpo pode ser desejável que quando o anticorpo sozinho é administrado a um paciente (por exemplo, um efeito terapêutico sinérgico pode ser alcançado através do uso de terapia de combinação que, por sua vez, permite o uso de uma dose menor do anticorpo para alcançar o efeito terapêutico desejado).

Interleucina 12 desempenha um papel crítico na patologia associada com uma variedade de doenças envolvendo elementos imunes e inflamatórios. Essas doenças incluem, mas não são limitados para artrite reumatóide, osteoartrite, artrite crônica juvenil, artrite de Lyme, artrite psoriática, artrite reativa, espondiloartropatia, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença inflamatória do intestino delgado, diabetes mellitus dependente de insulina, tiroidite, asma, doenças alérgicas, psoríase, dermatite esclerodérmica, dermatite atópica, doença do enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante de órgão, doença imune aguda ou crônica associada com transplante de órgão, sarcoidose, aterosclerose, coagulação intravascular disseminada, doença de Kawasaki, doença de Grave, síndrome nefrótica, síndrome de fadiga crônica, granulomatose de Wegener, púrpura Hensch-Schoenlein, vasculite microscópica dos rins, hepatite crônica ativa, uveíte, choque séptico, síndrome do choque tóxico, síndrome sepsis, caquexia, doenças infecciosas, doenças parasitárias, síndrome da imunodeficiência adquirida, mielite transversa aguda, córea de Huntington, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, derrame, cirrose biliar primária, anemia hemolítica, malignâncias, falências cardíaca, infarto do miocárdio, doença de Addison, esporádico, deficiência poliglandular do tipo I e deficiência poliglandular do tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de estresse respiratório adulto (agudo), alopecia, alopecia areata, artropatia soronegativa, doença de Reiter, artropatia psoriática, artropatia colítica ulcerativa, sinovite enteropática, clamídia, artropatia associada à yersínia e salmonela, espondiloartropatia, doença ateromatosa/arteriosclerose, alergia atópica, doença bolhosa autoimune, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, penfigóide, doença de IgA linear anemia hemolítica autoimune, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalite miálgica/Doença Livre Real, candidíase mucocutânea crônica, arterite de célula gigante, hepatite esclerosante primária, hepatite autoimune criptogênica, Síndrome da Doença da Imunodeficiência Adquirida, Doenças Relacionadas a Imunodeficiência Adquirida, Hepatite C, imunodeficiência variada comum (hipogamaglobulinemia variável comum), cardiomiopatia dilatada, infertilidade feminina, falência ovariana, falência ovariana prematura, doença fibrótica pulmonar, alveolite criptogênica fibrosante, doença pulmonar intersticial pós-inflamatória, pneumonite intersticial, doença tissular conectiva associada à doença pulmonar intersticial, doença tissular conectiva misturada associada com doença pulmonar, esclerose sistêmica associada com doença pulmonar intersticial, artrite reumatóide associada com doença pulmonar intersticial, lúpus sistêmico eritematoso associado com

doença pulmonar, dermatomiosite/polimiosite associada em doença pulmonar, doença de Sjogren associada com doença pulmonar, espondilite anquilosane associada a doença pulmonar, doença pulmonar vasculítica difusa, hemosiderose associada a doença pulmonar, doença pulmonar intersticial induzida por droga, fibrose de radiação, bronquiolite obliterante, pneumonia eosinofílica crônica, doença pulmonar infiltrada linfocítica, doença pulmonar intersticial pós-infecciosa, artrite gotosa, hepatite autoimune, hepatite autoimune do tipo 1 (autoimune clássica ou hepatite lúpóide), hepatite autoimune do tipo 2 (hepatite do anticorpo anti-LKM), hipoglicemia mediada por autoimunidade, resistência a insulina do tipo B com acantose nigricans, hipoparatiroidismo, doença imune aguda associada com transplante de órgão, doença imune crônica associada com transplante de órgão, osteoartrose, colangite esclerosante primária, leucopenia idiopática, neutropenia autoimune, doença renal NOS, glomerulonefrite, vasculite microscópica dos rins, doença de Lyme, lúpus eritematoso discóide, infertilidade idiopática masculina ou NOS, autoimunidade do esperma, esclerose múltipla (todos os subtipos), diabetes mellitus dependente de insulina, oftalmia simpática, hipertensão pulmonar secundária para a doença do tecido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestação pulmonar de poliarterite nodosa, febre reumática aguda, espondilite reumatóide, doença de Still, esclerose sistêmica, doença/arterite de Takayasu, trombocitopenia autoimune, trombocitopenia idiopática, doença da tireóide autoimune, hipertireoidismo, hipotireoidismo autoimune goitros (doença de Hashimoto), hipotireoidismo autoimune atrópico, mixoedema primário, uveíte phagocítica, vasculite primária e vitiligo. Os anticorpos humanos, e porções de anticorpo da invenção podem ser utilizados para tratar doenças autoimunes, em particular àquelas associadas com inflamação, incluindo, espondilite reumatóide, alergia, diabetes autoimunes, uveítes autoimunes.

Preferivelmente, os anticorpos da invenção ou porções ligadoras de antígenos dos mesmos, são utilizados para tratar artrite reumatóide, doença de Crohn, esclerose múltipla, diabetes mellitus dependente de insulina e psoríase, como descrito em mais detalhes na seção VII.

Um anticorpo humano, ou porção do anticorpo, da invenção também pode ser administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis no tratamento das doenças autoimunes e inflamatórias.

Anticorpos da invenção, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo pode ser utilizados sozinho ou em combinação para tratar tais doenças. Deve ser entendido que os anticorpos IL-12 da invenção ou porção ligadora de antígeno do mesmo pode ser utilizado sozinho ou em combinação com um agente adicional, por exemplo, um agente terapêutico, o referido agente adicional sendo selecionados pelo versado na técnica para seu propósito tencionado. Por exemplo, o agente adicional pode ser um agente terapêutico reconhecido na técnica como sendo útil para tratar a doença ou condição sendo tratado pelo anticorpo

pela presente invenção. O agente adicional também pode ser agente que dá um atributo benéfico para a composição terapêutica, por exemplo, um agente que afeta a viscosidade da composição.

5 Deve ser ainda entendido que as combinações que são para serem incluídas dentro desta invenção são aquelas combinações úteis para seu propósito tencionado. Os agentes revelados abaixo são ilustrativos para propósitos e não tencionam serem limitados. As combinações que são parte desta invenção podem ser os anticorpos da presente invenção e pelo menos um agente adicional selecionado a partir da lista abaixo. A combinação pode também incluir mais que um agente adicional, por exemplo, dois ou três agentes adicionais  
10 se a combinação é tal que a composição formada pode desempenhar sua função tencionada. Além disso, agentes adicionais descritos aqui usados em combinação com um anticorpo IL-12, não são limitados para o distúrbio ao qual eles são atribuídos para tratamento.

Combinação(s) preferida(s) é/são droga(s) antiinflamatória(s) não esteroide(s) também referidas como AINES que incluem drogas tipo ibuprofeno. Outras combinações preferidas são corticosteróides incluindo prednisolona; os bem conhecidos efeitos colaterais do  
15 uso do esteroide podem ser reduzidos ou menos eliminados por diminuir a dose de esteroide requerida quando pacientes tratados em combinação com anticorpos anti-IL-12 desta invenção. Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos para artrite reumatóide com os quais um anticorpo, ou porção de anticorpo da invenção podem ser combinados incluem o seguinte: droga(s) antiinflamatória(s) supressora(s) de citocina (CSAIDs); anticorpos para os  
20 antagonistas de outras citocinas humanas ou fatores de crescimento, por exemplo, TNF (incluindo adalimumab/HUMIRA), LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, e PDGF. Anticorpos da invenção, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem ser combinados com anticorpos para moléculas de superfície celular tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86  
25 (B7.2), CD90, ou seus ligantes incluindo CD154 (gp39 ou CD40L).

Combinações preferidas de agentes terapêuticos podem interferir em pontos diferentes na autoimunidade e cascata inflamatória subsequente; exemplos preferidos incluem antagonistas de TNF do tipo quimérico, anticorpos TNF humanizados ou humanos, D2E7,  
30 (Pedido Seriado dos EUA número 08/599.226, depositado em 9 de Fevereiro de 1996, cA2 (Remicade®), CDP 571, fragmentos do anticorpo anti-TNF (por exemplo, CDP870), e receptores de TNF p55 ou p75 solúvel, derivados dos mesmos, (p75TNFR1gG (Enbrel®) ou p55TNFR1gG (Lenercept), receptor de IL-12 solúvel (sIL-13), e também inibidores da enzima conversora de TNF $\alpha$  (ECTA); similarmente inibidores de IL-1 (por exemplo, inibidores da  
35 enzima conversora da interleucina 1, tais como Vx740, ou IL-1RA etc) pode ser efetivos para as mesmas razões. Outras combinações preferidas incluem interleucina 11, ligante de glicoproteína anti-P7s e p-selectina (PSGL). Ainda outra combinação preferida são outras

peças chaves da resposta autoimune que podem atuar em paralelo a, dependente de ou junto com a função da IL-12; especialmente preferidos são antagonistas de IL-18 incluindo anticorpos IL-18 ou receptores de IL-18 solúveis, ou proteínas de ligação de IL-18. Tem sido mostrado que IL-12 e IL-18 têm se sobreposto mas funções distintas e uma combinação de antagonistas para ambas podem ser mais efetiva. Ainda outra combinação preferida são inibidores anti-CD4 não depletantes. Ainda outras combinações preferidas incluem antagonistas da via co-estimulatória CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) incluindo anticorpos, receptores solúveis ou ligantes antagonísticos.

Anticorpos anti-IL-12, ou porções ligadoras de antígenos dos mesmos, podem também serem combinados com agentes, tais como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazima, olsalazima cloroquinina/hidroxicloroquina, penilamina, aurotiomalato (intramuscular e oral), azatioprina, cochicina, corticosteróides (oral, inalado e injeção local), agonistas beta-2-aderenoreceptor (salbutamol, terbutalina, salmeteral), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipratrópio e oxitrópio, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetila, leflunomida, AINES, por exemplo, ibuprofeno, corticosteróides tais como prednisolona, inibidores da fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interferem com sinalização por citocinas pró-inflamatórias tais como  $TNF\alpha$  ou IL-1 (por exemplo, inibidores da IRAK, NIK, IKK, p38 ou MAP quinase), inibidores da enzima conversora de IL-1 $\beta$  (por exemplo, Vx740), anti-P7s, ligante de glicoproteína p-selectina (PSGL), inibidores da enzima conversora de  $TNF\alpha$  (TACE), inibidores da sinalização de célula T tais como inibidores quinase, inibidores da metaloproteinase, sulfasalazina, azatioprina, mercaptopurinas 6, inibidores da enzima conversora de angiotensina, receptores de citocina solúveis e derivados dos mesmos (por exemplo, receptor de TNF p55 ou p75 solúveis e seus derivados p75TNFRlgG (Enbrel®) e p55TNFRlgG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 solúvel (sIL-12)) e citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF $\beta$ ). Combinações preferidas incluem metotrexato ou leflunomida e em casos de artrite reumatóide moderada ou severa, ciclosporina.

Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos para doença inflamatória do intestino com os quais um anticorpo anti-IL-12, ou porção do anticorpo, podem ser combinados incluem o seguinte: budenosida; fator de crescimento epidermal; corticosteróide; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicitado; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inibidores da lipoxigenase; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inibidores do tromboxano; antagonistas do receptor de IL-1; anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\beta$ ; anticorpos monoclonais anti-IL-6; fatores de crescimento; inibidores de elastase; compostos piridinil-imidazol; anticorpos para ou antagonistas de outras citocinas humanas ou fatores de crescimento, por exemplo, TNF (incluindo adalimumab/HUMIRA), LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16,

IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, e PDGF. Anticorpos da invenção, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem ser combinados com anticorpos para moléculas de superfície celular tais como CD2, CD3, CD4, Cd8, CD25, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 ou seus ligantes. Os anticorpos da invenção, ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem também ser combinados com agentes, tais como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetil, leflunomida, AINES, por exemplo, ibuprofeno, corticosteróides tais como prednisolona, inibidores da fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adranérgicos, agentes que interferem com sinalização por citocinas pró-inflamatórias tais como  $TNF\alpha$  ou IL-1 (por exemplo, inibidores da IRAK, NIK, IKK, p38 ou MAP quinase), inibidores da enzima conversora IL-1 $\beta$  (por exemplo, Vx740), anti-P7s, ligante de glicoproteína p-selectina (PSGL), inibidores da enzima conversora de  $TNF\alpha$ , inibidores da sinalização de célula T tais como inibidores quinase, inibidores da metaloproteinase, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, receptores de citocina solúveis e derivados dos mesmos (por exemplo, receptores de TNF p55 ou p75 solúveis, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 solúvel) e citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF $\beta$ ).

Exemplos preferidos de agentes terapêuticos para doença de Crohn em que um anticorpo ou uma porção ligadora de antígeno pode ser combinado incluem o seguinte: antagonistas do TNF, por exemplo, anticorpos anti-TNF, D2E7 (adalimumab/HUMIRA), cA2 (Remicade®), CDP571, fragmentos de anticorpo anti-TNF (por exemplo, CDP870), construções TNFR-Ig (p75TNFR-IgG (Enbrel®) e p55TNFR-IgG (Lenercept)), anti-P7s, ligante de glicoproteína p-selectina (PSGL), receptor de IL-13 solúvel (sIL-13), e inibidores de PDE4. Anticorpos da invenção ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem ser combinados com corticosteróides, por exemplo, budenosida e dexametasona. Anticorpos podem também ser combinados com agentes tais como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico e olsalazina, e agentes que interferem com síntese ou ação de citocinas pró-inflamatórias tal como IL-1, por exemplo, inibidores da enzima conversora de IL-1 $\beta$  (por exemplo, Vx740) e IL-1ra. Anticorpos ou porção ligadora de antígeno do mesmo podem também ser utilizados com inibidores de sinalização de célula T, por exemplo, inibidores da tirosina quinase, 6-mercaptopurinas. Anticorpos ou porções de ligação de antígeno dos mesmos, podem ser combinados com IL-11.

Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos para esclerose múltipla com um anticorpo, ou porção do anticorpo, podem ser combinados incluem a seguinte: corticosteróide; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferon- $\beta$ 1a (Avonex; Biogen); interferon- $\beta$ 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; Copaxona; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxigê-

nio hiperbárico; imunoglobulina intravenosa; clabribina; anticorpos para ou antagonistas de outras citocinas humanas de fatores de crescimento, por exemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, e PDGF. Anticorpos da invenção, ou porções ligadores de antígeno dos mesmos, podem ser combinados com anticorpos para moléculas de superfície celular tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 ou seus ligantes. Os anticorpos da invenção, ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, podem também ser combinados com agentes, tais como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetila, leflunimida, AINEs, por exemplo, ibuprofeno, corticosteróides tais como prednisolona, inibidores da fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interferem com a sinalização por citocinas pró-inflamatórias tais como TNF $\alpha$  e IL-1 (por exemplo, inibidores da IRAK, NIK, IKK, p38 ou MAP quinase), inibidores da enzima conversora de IL-1 $\beta$  (por exemplo, Vx740), anti-P7s, ligante de glicoproteína p-selectina (PSGL), inibidores da TACE,, inibidores da sinalização de célula T tal como inibidores quínase, inibidores de metaloproteinase, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina, receptores de citocina solúveis e derivados dos mesmos (por exemplo, receptores de TNF p55 ou p75 solúveis, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 solúvel (sIL-13)) e citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$ ).

Exemplos preferidos dos agentes terapêuticos para esclerose múltipla em que o anticorpo ou porção ligadora de antígeno do mesmo podem ser combinados para incluir interferon  $\beta$ , por exemplo, IFN $\beta$ 1a e IFN $\beta$ 1b; copaxona, corticosteróides, inibidores de IL-1, inibidores de TNF, e anticorpos para ligante de CD40 e CD80.

Um anticorpo, porção de anticorpo, pode ser utilizado em combinação com outros agentes para tratar condições da pele. Por exemplo, um anticorpo, porção de anticorpo, ou outro inibidor de IL-12 da invenção é combinado com terapia PUVA. PUVA é uma combinação de psoraleno (P) e radiação ultravioleta de onda longa (UVA) que é utilizada para tratar muitas condições diferentes da pele. Os anticorpos, porções de anticorpos, ou outros inibidores da IL-12 da invenção podem também ser combinados com pimecrolimus. Em outra modalidade, os anticorpos da invenção são utilizados para tratar psoríase, em que os anticorpos são administrados em combinação com tacrolimus. Em uma modalidade adicional, tacrolimus e inibidores de IL-12 são administrados em combinação com metotrexato e/ou ciclosporina. Em ainda outra modalidade, o inibidor de IL-12 da invenção é administrada com tratamento de excimer laser para tratar psoríase.

As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapêuticamente efetiva" ou uma "quantidade profilaticamente efetiva" de um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapêuticamente efetiva" refere-se a uma quan-

tidade efetiva, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com os fatores tais como estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a habilidade do anticorpo ou porção do anticorpo para eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente efetiva é também uma em que qualquer efeito tóxico ou que causa detrimento do anticorpo ou porção do anticorpo são resolvidos pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente efetiva" refere-se a uma quantidade efetiva, em doses e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, desde que a dose profilática é utilizada em pacientes antes de ou em um estágio anterior da doença, o quantidade profilaticamente efetiva será menor que a quantidade terapeuticamente efetiva.

Regimes de dose podem ser ajustados para prover a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta profilática ou terapêutica). Por exemplo, uma pílula única pode ser administrada, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado por exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dose única para fácil administração e uniformidade de dose. Forma de dose única como aqui utilizado refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como doses únicas para os pacientes mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada do composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dose única da invenção são direcionadas por e diretamente dependente de (a) características únicas do composto ativo e a terapêutica particular ou efeito profilático a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de compostos tal um composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

Em uma modalidade, o anticorpo IL-12, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado ou um regime de dose quinzenalmente, incluindo, por exemplo, variando a dose quinzenalmente a partir de cerca de 50 a 300 mg, uma variação de dose de cerca de 100 mg a cerca de 200 mg, e uma dose de cerca de 125 a cerca de 175 mg. Alternativamente, o anticorpo IL-12 pode ser administrado como um tem um tempo de dose, incluindo, por exemplo, uma dose de cerca de 200 mg de dose, uma dose de cerca de 100 mg. Em outra modalidade, o anticorpo IL-12 é administrado em um regime de dose semanal, incluindo, por exemplo, uma dose variando de cerca de 50 a 300 mg, uma dose variando de cerca de 100 mg a cerca de 200 mg, e uma dose de cerca de 125 a cerca de 175 mg. Deve ser notado que doses dentro das variações especificadas são também inclusos aqui, por exemplo, 85 mg, 97 mg etc.

Em outra modalidade, um anticorpo IL-12 humano, ou porção ligadora de antígeno

do mesmo, é administrado como uma dose única a um paciente tendo um distúrbio em que atividade de IL-12 ser em detrimento, por exemplo, psoríase, que resulta em tratamento. Uma resposta ao anticorpo IL-12, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, pode ser mantida por um período prolongado em um paciente. Manutenção de uma resposta pode ser monitorada de acordo com o distúrbio sendo tratado. Por exemplo, manutenção de uma resposta com um anticorpo IL-12, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, para tratar psoríase podem ser determinado pela resposta PASI 75 do paciente ao longo do tempo.

É para ser notado que valores de dosagem podem variar com o tipo e severidade da condição a ser tratada. É para ainda ser entendido que para qualquer paciente particular, regimes de dose específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e julgamento profissional da pessoa administrando ou supervisionando a administração das composições e estas variações de dose reveladas aqui é exemplares somente, e não tencionam limitar o objetivo ou prática da composição reivindicada.

#### VII. Usos da Invenção

A invenção provê um método para inibir a atividade de IL-12 em um paciente sofrendo de um distúrbio em que a atividade de IL-12 é maléfica. Em uma modalidade, a invenção provê um método de tratar psoríase compreendendo a administração de uma dose única de um anticorpo IL-12, ou uma porção ligadora de antígeno do mesmo.

IL-12 tem sido implicada na patofisiologia de uma grande variedade de distúrbios (Windhagen *et al* (1995) *J. Exp. Med.* 182:1985-1996; Morita *et al* (1998) *Arthritis and Rheumatism* 41:306-314; Bucht *et al* (1996) *Clin. Exp. Immunol.* 103:347-367; Fais *et al* (1994) *J. Interferon Res.* 14:235-238; Parronchi *et al* (1997) *Am. J. Path.* 150:823-832; Monteleone *et al* (1997) *Gastroenterology* 112:1169-1178, e Berrebi *et al* (1998) *Am J Path* 152:667-672; Parronchi *et al* (1997) *Am J Path* 150:823-832). A invenção prove métodos para inibir a atividade de IL-12 em um paciente sofrendo de tal distúrbio, cujo método compreende a administração ao paciente de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção tal que a atividade de IL-12 no paciente é inibida. Preferivelmente, a IL-12 é IL-12 humana e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero expressando uma IL-12 com a qual um anticorpo da invenção reage de forma cruzada. Ainda adicional o paciente pode ser um mamífero em que tenha sido introduzida hIL-12 (por exemplo, por administração da hIL-12 ou por expressão de um transgênico hIL-12). Um anticorpo da invenção pode ser administrado a um paciente humano para propósitos terapêuticos (discutido ainda abaixo). Além disso, um anticorpo da invenção pode ser administrado a um mamífero não humano expressando uma IL-12 com a qual o anticorpo reage cruzadamente por propósitos veterinários ou como um modelo animal de doença humana. Com relação ao último, tais modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica de anticorpos da invenção (por exemplo, testando as doses e cursos temporais de administra-



ção).

Como aqui utilizado, a frase “um distúrbio em que a atividade de IL-12 é maléfica” é tencionado incluir doenças e outros distúrbios em que a presença de IL-12 em um paciente sofrendo do distúrbio tem sido mostrada ser ou é suspeitado ser responsável pela patofisiologia do distúrbio ou um fator que contribui para a piora do distúrbio. Consequentemente, um distúrbio em que a atividade da IL-12 é maléfica é um distúrbio em que a inibição da atividade de IL-12 é esperada para aliviar os sintomas e/ou progressão do distúrbio. Tais distúrbios podem ser evidenciados, por exemplo, pelo aumento na concentração da IL-12 em um fluido biológico a um paciente sofrendo a partir do distúrbio (por exemplo, um aumento na concentração da IL-12 no soro, plasma, fluido sinovial etc, do paciente), que pode ser detectada, por exemplo, utilizando um anticorpo anti-IL-12 como descrito acima. Existem numerosos exemplos de distúrbios em que a atividade de IL-12 é maléfica. Em uma modalidade, os anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo, podem ser utilizados na terapia para tratar as doenças ou distúrbios descritos abaixo. Em outra modalidade, os anticorpos ou porções ligadoras de antígeno dos mesmos, podem ser utilizados para fabricação de um medicamento para tratar as doenças ou distúrbios descritos aqui. O uso dos anticorpos e porções de anticorpos da invenção no tratamento de uns poucos distúrbios específicos não limitantes é discutido ainda abaixo:

#### A. Artrite Reumatóide

Interleucina 12 tem sido implicada em desempenhar um papel nas doenças inflamatórias tal como artrite reumatóide. Mensagem de IL-12p40 induzível tem sido detectada na sinóvia a partir de pacientes com artrite reumatóide e IL-12 tem sido mostrado estar presente nos fluídos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide (ver, por exemplo, Morita *et al* (1998) *Arthritis and Rheumatism* 41:306-314). Células positivas para IL-12 têm sido encontradas estarem presentes na camada celular da sinóvia da artrite reumatóide. Os anticorpos, e porções de anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar, por exemplo, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, artrite Lyme, espondilite reumatóide, osteoartrite e artrite gotosa. Tipicamente, o anticorpo, ou porção de anticorpo, é administrado sistematicamente, embora para certos distúrbios, administração local do anticorpo ou porção do anticorpo pode ser benéfica. Um anticorpo, ou porção do anticorpo, da invenção também pode ser administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis no tratamento de doenças autoimunes.

No modelo murino de artrite induzida por colágeno (AIC) para artrite reumatóide, tratamento de camundongos com um anti-IL-12 mAb (anticorpo IL-12 monoclonal rat anti-camundongo, C17.15) antes da artrite profundamente suprimir o início, e reduzido a indifênci e severidade da doença. Tratamento com anti-IL-12 mAb antes do início da seeridade da artrite reduzida, mas tratamento tardio de camudongos com anti-IL-12 mAb após o início de

doença tiveram efeito mínimo na severidade da doença.

#### B. Doença de Crohn

Interleucina 12 também desempenha um papel na doença do inflamatória do intestino, doença de Crohn. Expressão aumentada da IFN- $\gamma$  e IL-12 ocorre na mucosa intestinal dos pacientes com doença de Crohn (ver, por exemplo, Fais *et al* (1994) *J. Interferon Res.* 14:235-238; Parronchi *et al* (1997) *Amer. J. Pathol.* 150:823-832; Monteleone *et al* (1997) *Gastroenterology* 112:1169-1178; Berrebi *et al* (1998) *Amer. J. Pathol.* 152:667-672). Anticorpos anti-IL-12 têm sido mostrado para suprimir doença em modelos camundongo de colite, por exemplo, colite de camundongo deficiente para IL-2 induzida por TNBS, e recentemente em camundongos deficiente IL-10. Consequentemente, os anticorpos, e porções de anticorpo, da invenção, podem ser utilizados no tratamento de doenças inflamatórias do intestino.

#### C. Esclero Múltipla

Interleucina 12 tem sido implicada como mediador chave de esclerose múltipla. Expressão de mensageiro de IL-12p40 induzível ou IL-12 por si só pode ser demonstrada em lesões de pacientes com esclerose múltipla (Windhagen *et al* (1995) *J. Exp. Med.* 182:1985-1996, Drulovix *et al* (1997) *J. Neurol. Sci.* 147: 145-150). Pacientes crônicos progressivos com esclerose múltipla têm elevados níveis circulantes de IL-12. Investigações com células T e células apresentadoras de antígeno (APCs) a partir de pacientes com esclerose múltipla revelou uma série de auto-perpetuação de interações imunes como a base da esclerose múltipla progressiva levando a uma resposta imune do tipo Th1. Secreção aumentada do IFN- $\gamma$  a partir de células T levam a produção de IL-12 aumentada por APCs, que perpetuaram o ciclo levando a um estado crônico de uma ativação imune tipo Th1 e doença (Balashov *et al* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:599-603). O papel de IL-12 na esclerose múltipla tem sido investigada utilizando modelos encefalomielite alérgica experimental de camundongo e rato (EAE) de esclerose múltipla. Em um modelo EAE decair-remitir de esclerose múltipla em camundongos, pré-tratamento com anti-IL-12 mAb retarda a paralisia e reduz índices clínicos. Tratamento com anti-IL-12 mAb no pico da paralisia ou durante a subsequente período de remissão reduziu índices clínicos. Consequentemente, os anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo da invenção podem servir para aliviar sintomas associados com esclerose múltipla em humanos.

#### D. Diabetes Mellitus Dependente de Insulina

Interleucina -12 tem sido implicada como um mediador importante de diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI). DMDI foi induzida em camundongos NOD por administração da IL-12, e anticorpos anti-IL-12 foram protetora em um modelo de transfência adotiva de DMDI. Pacientes DMDI com início precoce sempre experienciam um assim chamado "período de lua de mel" durante o qual algum resíduo de função das células das ilho-

tas é mantido. Essas células da ilhota residuais produzem insulina e regulam níveis de glicose sanguínea melhor que a insulina administrada. Tratamento desses pacientes com início precoce com um anticorpo anti-IL-12 pode prevenir destruição adicional das células da ilhota, assim mantendo uma fonte endógena de insulina.

## 5 E. Psoríase

Interleucina-12 (IL-12) e a relatada citocina IL-23 têm sido implicadas como mediadores-chaves em psoríase. Psoríase envolve lesões cutâneas agudas e crônicas que são associadas com um perfil de expressão de citocina do tipo Th1 (Hamid *et al* (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.* 1:225-231; Turka *et al* (1995) *Mol. Med.* 1:690-699). Ambas, IL-12 e IL-23 contribuem para o desenvolvimento da resposta imune de célula T auxiliar do tipo 1 (Th1) em psoríase. Além disso, RNA mensageiro de IL-12 p40 e IL-23 p40 é superexpresso em lesões cutâneas psoriáticas. Conseqüentemente, os anticorpos ou porções ligadoras de antígeno do mesmo da invenção podem servir para aliviar distúrbios cutâneos tal com psoríase.

Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar psoríase. Tratamento para psoríase sempre inclui um corticosteróide tópico, análogos de vitamina D, e retinóides tópicos ou orais, ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um anticorpo IL-12 e/ou IL-23 é administrado em combinação com ou a presença de um desses tratamentos comuns. Agentes terapêuticos adicionais que podem ser combinados com o anticorpo IL-12 e/ou IL-23 para tratamento de psoríase são descritos em maiores detalhes abaixo.

O diagnóstico da psoríase é usualmente baseado na aparência da pele. Adicionalmente uma biópsia da pele, ou raspagem e cultura de adesivos da pele podem ser necessárias para excluir outros distúrbios da pele. Um raio X pode ser utilizado para checar para artrite psoriática se dores nas juntas estão presentes e persistentes.

Melhoramentos em psoríase em um paciente podem ser monitorados por Área Psoriática e Índice de Severidade (PASI) dos pacientes. O método para determinar o PASI tem sido descrito em Fredriksson e Pettersson (1978) *Dermatologica* 157:238 e Marks *et al* (1989) *Arch Dermatol* 125:235. Brevemente, o índice é baseado na avaliação dos quatro sítios anatômicos, incluindo a cabeça, extremidades superiores, tronco, e extremidades inferiores, para eritema, induração e descamação utilizando uma escale de 5 pontos (0= nenhum sintoma; 1= leve, 2= moderado, 3= marcado; 4= muito marcado). Baseado na extensão das lesões em um dado sítio anatômico, a área afetada é assinalada com um valor numérico (0=0; 1=<10%; 2=10-29%; 3=30-49%; 4=50-69%; 5=70-89%; 6=90-100%). O índice PASI é então calculado, em que o variação possível do índice PASI é 0,0 a 72,0 com o índice mais alto representando eritroderma completo do mais severo grau.

Em uma modalidade da invenção, um anticorpo IL-12 e/ou IL-23 é utilizado para o tratamento da psoríase, incluindo placa psoriática crônica, psoríase gotosa, psoríase inversa, psoríase pustular, pemphigus vulgaris, psoríase eritrodérmica, psoríase associada com

doença inflamatória do intestino (DII), e psoríase associada com artrite reumatóide (AR). Em outra modalidade, um anticorpo IL-12 e/ou IL-23, tal como J695/ABT-874, é utilizado para tratar pacientes que têm psoríase em combinação com PsA. Tipos específicos de psoríases incluídas nos métodos de tratamento da invenção são descritos em detalhes abaixo:

5 a. Placa psoriática crônica

Placa psoriática crônica (também referido como psoríase vulgaris) é a forma mais comum de psoríase. Placa psoriática crônica é caracterizada pelo aumento de placas vermelhas da pele, variando de um tamanho de moeda a muito maiores. Na placa psoriática crônica, as placas podem ser únicas ou múltiplas, elas podem variar em tamanho a partir de poucos milímetros para vários centímetros. As placas são usualmente vermelhas com uma superfície escamosa, e refletem luz quando gentilmente raspadas, criando um efeito “prateado”. Lesões (que são sempre simétricas) a partir da placa psoriática crônica ocorrem em todo o corpo, mas com predileção para superfícies extensoras, incluindo joelhos, cotovelos, regiões lombo-sacrais, escalpo, e unhas. Ocasionalmente placa psoriática crônica pode ocorrer no pênis, vulva e flexões, mas escamação é usualmente ausente. Diagnóstico de pacientes com placa psoriática crônica é usualmente baseado nas características clínicas descritas acima. Em particular, a distribuição, cor e escamação prateada típico da lesão na placa psoriática crônica são características da placa psoriática crônica.

b. Psoríase Gotosa

20 Psoríase gotosa refere-se a uma forma de psoríase com placas escamosas no formato de gotas de água características. Rubores de psoríase gotosa geralmente seguem uma infecção, mais notavelmente uma infecção de garganta estreptocócica. Diagnóstico de psoríase gotosa é usualmente baseado na aparência da pele, e o fato que existe sempre uma história de dor de garganta recente.

25 c. Psoríase Inversa

Psoríase inversa é uma forma de psoríase em que o paciente tem pele suave, usualmente áreas úmidas da pele que são vermelhas e inflamadas, que é improvável a escamação associada com placa psoriática. Psoríase inversa é também referida como uma psoríase intertriginosa ou psoríase flexural. Psoríase inversa ocorre na maioria das vezes em axilas, virilha, sob os seios e em outras dobraduras da pele ao redor dos genitais e nádegas, e, como um resultado das localizações de apresentação, rubor e suor podem irritar as áreas afetadas.

d. Psoríase Pustular

35 Psoríase pustular, também referida como psoríase palmar plantar, é uma forma de psoríase que causa bolhas cheias de pus que variam de tamanho e localização, mas sempre ocorrem nas mãos e nos pés. As bolhas podem ser localizadas, ou espalhadas ao longo de áreas do corpo. Psoríase pustular pode ser ambos, suave ou dolorosa, pode causa fe-

bres.

e. Outros distúrbios psoriáticos

Outros exemplos de distúrbios psoriáticos que podem ser tratados com anticorpo IL-12 e/ou IL-23 incluem psoríase eritrodérmica, vulgaris, psoríase associada com IBD, e psoríase associada com artrite, incluindo artrite reumatóide.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser construídos como limitantes em qualquer modo. Os conteúdos de todas as referências citadas, incluindo referências de literatura, patentes emitidas, e pedidos de patente publicados, como citado através deste pedido são aqui incorporados por referência. Deve ser ainda entendido que os conteúdos de todas as tabelas em anexo aqui (ver Apêndice A da Patente dos EUA No. 6.914.128) bem como os conteúdos inteiros da Patente dos EUA No. 6.914.128 são aqui incorporados por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Eficácia do Anticorpo Monoclonal Inteiro IL-12/IL-23 Humano, ABT-874, No Tratamento de Placa Psoriática Moderada a Severa

ABT-874 é um anticorpo humano completo contra interleucina 12 (IL-12) e IL-23. Ele se liga com grande afinidade à subunidade p40 comum de ambos, IL-12 e IL-23, ambos alvos validados no tratamento de psoríase (Ps).

O objetivo do seguinte estudo foi avaliar a eficácia das injeções subcutâneas de ABT-874 no tratamento de pacientes com placa Ps moderada a severa.

Pacientes adultos com Ps afetando  $\geq 10\%$  de área de superfície corporal (ASC) e uma Área Psoriática e Índice de Severidade (PASI)  $\geq 12$  na linha de base foram eleitos para este estudo de 12 semanas, duplo-cego, controlado por placebo. Pacientes foram aleatoriamente para 1 de 6 braços: 1) 100 mg de ABT-874 a cada outra semana (cos) por 12 semanas; 2) uma dose de 200 mg de ABT-874 na semana 0; 3) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 4 semanas; 4) 200 mg de ABT-874 cos por 12 semanas; 5) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 12 semanas; ou 6) placebo. Ponto primário foi uma resposta  $\geq \text{PASI}75$  na Semana 12. Outras avaliações de eficácia incluíram o PASI50 e a Avaliação Global do Médico (AGM). Pacientes que encontraram o ponto primário entraram na fase cega/retratamento na semana 36 e foram monitorados por tempo de perda de resposta.

Um total de 180 pacientes participou do estudo, 30 em cada braço. Características de base foram similares entre braços e indicaram Ps de moderada a severa (todos os valores são média exceto % macho): idade, 46 anos, 74% machos; 21 anos duração Ps; PASI19; e 25% de ASC afetado. Na semana 12, as porcentagens de pacientes alcançaram  $\geq \text{PASI}75$  foram estatisticamente significativamente maior para pacientes em cada um dos 5 braços ABT-874 vs. Placebo (93%, 63%, 90%, 93%, 90% vs. 3%, respectivamente,  $p < 0,001$ , ITT). Em adição, as porcentagens de pacientes alcançaram  $\geq \text{PASI}50$  foram estatisticamen-

te significativamente maior para pacientes em cada um dos 5 braços ABT-874 vs. Placebo (100%, 77%, 97%, 97% e 100% vs. 17%,  $p < 0,001$ ). A média de porcentagem diminuiu (melhoria) em PASI na Semana 12 foram 90%, 70%, 92%, 92% e 90%, respectivamente, nos braços ABT-874, e 26% placebo. Similarmente, as porcentagens de pacientes com um ASC de Clara/Mínima foram 83%, 50%, 73%, 87% e 87%, respectivamente, nos braços ABT-874, e 3% para placebo.

Em conclusão, ABT-874 foi significativamente mais eficaz que placebo no tratamento de placa psoriática moderada a severa.

Exemplo 2: Segurança e Eficácia do Anticorpo Monoclonal Inteiro IL-12/IL-23 Humano, ABT-874, No Tratamento de Placa Psoriática Moderada a Severa

ABT-874 é um anticorpo humano completo contra interleucina 12 (IL-12) e IL-23. Ele se liga com grande afinidade à subunidade p40 comum de ambos, IL-12 e IL-23, alvos validados no tratamento de psoríase (Ps). O objetivo desta Fase II foi investigar a eficácia e segurança das injeções subcutâneas de ABT-874 no tratamento de pacientes com placa Ps moderada a severa.

Pacientes adultos com Ps afetando  $\geq 10\%$  de área de superfície corporal (ASC) e um índice PASI  $\geq 12$  foram eleitos para este estudo de 12 semanas, duplo-cego, controlado por placebo. Pacientes foram aleatoriamente para 1 de 6 braços: 1) 100 mg de ABT-874 a cada outra semana (cos) por 12 semanas; 2) uma dose de 200 mg de ABT-874 na semana 0; 3) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 4 semanas; 4) 200 mg de ABT-874 cos por 12 semanas; 5) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 12 semanas; ou 6) placebo. Ponto primário foi uma resposta  $\geq \text{PASI}75$  na Semana 12. Pacientes que encontraram o ponto primário entraram na fase cega/re-tratamento na semana 36 e foram monitorados por tempo de perda de resposta. Todos os pacientes foram avaliados para segurança na semana 54.

180 pacientes participaram 30 em cada braço. Características de base foram similares entre braços (todos os valores são média exceto % macho): idade, 46 anos, 74% machos; 21 anos duração Ps; PASI19; e 25% de ASC afetado. Na semana 12, as porcentagens de pacientes com  $\geq \text{PASI}75$  foram estatisticamente significativamente maior para pacientes em cada um dos 5 braços ABT-874 vs. Placebo (93%, 63%, 90%, 93%, 90% vs. 3%, respectivamente,  $p < 0,001$ , ITT). Durante a semana 12, fase DC, EAs infecciosas para os grupos ABT-874 variou de 23-43% e para o grupo placebo foi 23% com a mais comum sendo nasofaringite (7-17% para ABT-874, 3% para placebo). Não existiram diferenças significativas entre os braços. Nenhuma infecção séria EAs foi reportada, e nenhuma morte ocorreu.

Em conclusão, ABT-874 foi significativamente mais eficaz que placebo no tratamento de placa Ps moderada a severa, e parece ter um perfil de segurança favorável.

Exemplo 3: Manutenção de Resposta com o Anticorpo Monoclonal Inteiro IL-12/IL-

### 23 Humano, ABT-874, No Tratamento de Placa Psoriática Moderada a Severa

A eficácia e segurança do ABT-874 foram avaliadas na semana 12, Fase II, em triagem controlada e aleatória e 36 semanas de fase de acompanhamento. O objetivo do seguinte exemplo foi analisar a manutenção da resposta seguindo a descontinuação de terapia durante a segunda semana 12 desta Fase II das injeções subcutâneas do ABT-874 no tratamento da placa Ps moderada a severa.

Adultos com Ps afetando  $\geq 10\%$  de área de superfície corporal (ASC) e um índice PASI  $\geq 12$  foram eleitos para este estudo de 12 semanas, duplo-cego, controlado por placebo. Pacientes foram aleatoriamente para 1 de 6 braços:

- 10           1) 100 mg de ABT-874 a cada outra semana (cos) por 12 semanas;
- 2) uma dose de 200 mg de ABT-874 na semana 0;
- 3) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 4 semanas;
- 4) 200 mg de ABT-874 cos por 12 semanas;
- 5) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 12 semanas; ou
- 15           6) placebo.

O ponto primário foi uma resposta  $\geq \text{PASI}75$  na Semana 12. Pacientes que encontraram o ponto primário entraram na fase cega/re-tratamento na semana 36. Tratamento com a droga de estudo foi descontinuado, e pacientes foram monitorados por tempo para perda de resposta (uma diminuição no índice PASI, qualquer tempo durante as 36 semanas que se seguiram ao período, para  $< \text{PASI}50$ ). Manutenção da resposta PASI foi avaliada até a Semana 24.

Um total de 180 pacientes participou do estudo, 30 em cada braço. Características de base foram similares entre braços (valores são média exceto % macho): idade, 46 anos, 74% machos; 21 anos duração Ps; PASI19; e 25% de ASC afetado.

25           Na semana 12, as porcentagens de pacientes com  $\geq \text{PASI}75$  foram estatisticamente significativamente maior para pacientes em cada um dos 5 braços ABT-874 vs. Placebo (Tabela 1). Na semana 24, porcentagens substanciais de responsivos ao PASI 75 nos braços de tratamentos ativos mantiveram pelo menos uma resposta PASI 50.

Tabela 1. Eficácia na Semana 24 do ABT-874

	$\geq$ PASI75 Na semana 12	Manutenção da Reposta PASI: Semana 24 vs. Semana 12
100 mg cos por 12 semanas	28/30 (93%)*	24/28 (86%)
200 mg Uma dose	19/30 (63%)*	15/19 (79%)
200 mg cada semana por 4 semanas	27/30 (90%)*	23/27 (85%)
200 mg cos por 12 semanas	28/30 (93%)*	26/28 (93%)
200 mg cada semana por 12 semanas	27/30 (90%)*	26/27 (96%)
Placebo	1/30 (3%)	—

\* $p < 0.001$  vs. placebo, NRI.

Em conclusão, ABT-874 foi significativamente mais eficaz que placebo no tratamento de placa Ps moderada a severa. Percentagens substanciais de PASI 75 de responsivos mantiveram essas respostas na Semana 24, seguindo descontinuação da terapia ativa.

#### 5 Exemplo 4: Segurança e Eficácia do ABT-874, um Anticorpo Monoclonal Inteiro IL-12/IL-23 Humano, ABT-874, No Tratamento de Placa Psoriática Moderada a Severa

O objetivo do seguinte exemplo foi demonstrar a eficácia e segurança de uma variedade de doses de um anticorpo monoclonal IL-12/23 humano (ABT-874) comparado com o placebo no tratamento de pacientes com placa psoriática crônica moderada a crônica clinicamente estável.

##### I. Materiais e Métodos

A. Desenho do Estudo: O seguinte estudo foi uma triagem de 12 semanas, multicentro, aleatória, duplo-cega, de fase II, controlada por placebo que foi conduzida em 24 centros dos Estados Unidos (16 sítios) e Canadá (8 sítios). ABT-874 (Laboratórios Abbott, Abbott Park, IL) é um anticorpo monoclonal humano com regiões determinantes de complementares geneticamente construídos que têm alta afinidade para para a proteína da subunidade p40 de IL-12/23. Pacientes foram aleatorizados em uma proporção de 1:1:1:1:1:1 para receber 1 de 6 tratamentos: 200 mg de ABT-874, 1 dose na semana 0 (200 mg x 1); 100 mg de ABT-874 a cada outra semana (cos) por 12 semanas; 200 mg de ABT-874 semanalmente para as primeiras 4 semanas (200 mg x 4); 200 mg de ABT-874 cos por 12 semanas (200



mg cos); 200 mg de ABT-874 a cada semana por 12 semanas (200 mg semanalmente); ou placebo. Após a semana 12, todos os pacientes que alcançaram pelo menos uma redução de 75% de resposta na área psoriática e índice de severidade (PASI 75) continuada nas 36 semanas de fase de observação cega/ e re-tratamento.

5           B. Pacientes: Pacientes foram  $\geq 18$  anos de idade e tiveram diagnóstico clínico de psoríase por pelo menos 6 meses (determinado por entrevista com o paciente e confirmação do diagnóstico através de exame físico pelo investigador), placa psoriática estável por pelo menos 2 meses antes de selecionar e em visitas de base como determinado pela entrevista do paciente, placa psoriática moderada a severa definida por  $\geq 10\%$  da área de superfície corporal (ASC) envolvida na visita de base, um índice PASE de  $\geq 12$  na visita de base, e  
10           uma avaliação global do médico (AGM) de pelo menos doença moderada na visita de base.

Pacientes foram inelegíveis se eles tiveram prévia exposição à terapia sistêmica ou biológica anti-IL-12; psoríase não placa; incapacidade para descontinuar as seguintes terapias antes da visita de base: terapias de psoríase tópica pelo menos 2 semanas antes, fototerapia com luz ultravioleta B pelo menos 2 semanas antes, fototerapia de psoraleno-luz ultravioleta em pelo menos 4 semanas antes, terapias sistêmicas pelo menos 4 semanas antes, e terapias biológicas pelo menos 12 semanas antes; ingestão requerida de corticosteróides orais ou injetáveis durante o estudo (corticosteróide inalado para condições médicas estáveis foram permitidas); uma exacerbação da asma requerendo hospitalização nos 10  
15           anos anteriores da seleção; uma infecção ou fatores de risco para infecção severa; uma história de malignâncias outro que carcinoma celular basal tratada com sucesso (pacientes com uma história de carcinoma celular escamoso foram excluídos) ou carcinoma cervical no local; ou uma história de reação imunológica principal (por exemplo doença sérica ou reação anafilactóide) para um agente contendo imunoglobulina G (por exemplo, gama globulina  
20           intravenosa, uma proteína de fusão, ou anticorpo monoclonal).

Pacientes foram permitidos continuar tratamento com xampu medicado que não contém corticosteróides, emolientes brandos (sem ácidos beta- ou alfa-hidróxi), ou corticosteróide tópico de baixa potência de Classe VI e VII em suas palmas, solas, face, área inflamatória, e área da virilha durante o curso do estudo. Aplicação dessas terapias de psoríase  
30           tópica não foi ocorrer dentro de 24 horas de uma visita de estudo. Vacinação com um agente viral vivo não foi permitido dentro de 1 mês antes do doseamento com ABT-874, durante o estudo, ou por 1 mês após a última dose da droga em estudo ser administrada.

Ocorrência de qualquer dos seguintes resultados de laboratório clinicamente significativamente anormais levaram a imediata retirada de um paciente do estudo: aspartato transaminase ou alanina transaminase  $> 5$  vezes o limite superior normal; bilirrubina sérica total  
35            $> 3$  vezes o limite superior normal; creatinina séria  $> 3$  vezes o limite superior normal; creatinina fosfoquinase  $> 5$  vezes o limite superior normal; hemoglobina  $< 8$  g/dL; contagem de célu-

las brancas  $2 \times 10^9/L$ ; ou contagem de plaquetas  $< 75 \times 10^9/L$ .

5 C. Avaliação da eficácia: A avaliação da eficácia primária foi a porcentagem de pacientes alcançando uma resposta PASI 75 na semana 12, definida como pelo menos 75% de redução no índice PASI relativo ao índice da linha de base. PASI é uma medida da severidade das lesões psoriáticas (em termos de eritema, induração e descamação) e a extensão do envolvimento ASC. O índice PASI varia de 0 (sem psoríase) a 72 (doença severa) (Fredriksson T, Pettersson U., *Dermatologica* 1978; 157:238-44). Outras medidas de eficácia incluíram a porcentagem de pacientes que alcançaram pelo menos PASI 75 nas semanas 1, 2, 4 e 8; a porcentagem de pacientes que alcançaram pelo PASI 50 ou PASI 90 nas semanas 1, 2, 4, 8 e 12; e a porcentagem de pacientes que realizaram um AGM limpo ou mínimo na semana 12 e nas semanas 1, 2, 4 e 8. O AGM mede a severidade da doença em uma escala de 6 pontos, que varia de 0 (nenhuma doença, ou limpo) a 5 (muito severo) (Ko H-S Clinical trial design in psoriasis. Apresentado na 49ª Reunião do Comitê Consultivo Dermatológico e Oftalmológico; 20 de Março de 1998; Bethesda, MD).

15 D. Avaliação de Segurança: Eventos adversos, dados de laboratórios, e sinais vitais foram avaliados através do estudo. Pacientes foram monitorados de perto para sinais de infecção, malignância, e reação imunológica. Tratamento-emergência de EAs foi definido como aqueles eventos que ocorreram entre a semana os primeiros 45 dias após a última dose da droga de estudo não perdida ou dia 1 antes da primeira dose de re-tratamento (para aqueles pacientes que continuaram na semana 36 de triagem).

20 E. Análise Estatística: O tamanho da amostra foi calculado utilizando nQuery Advisor® 4.0 (Statistical Solutions, Saugus, MA). Assumindo que 15% dos pacientes no grupo placebo podem alcançar uma resposta PASI 75 na semana 12, os idealizadores do estudo determinaram que um tamanho de amostra de 26 em cada grupo de dosagem pode ser adequado para detectar pelo menos 45% de diferença a partir do grupo tratado utilizando o teste exato de Fisher com 90% de potência em um nível de 0,05 2-lados de significância. O estudo foi desenhado para compreender aproximadamente 180 pacientes, com 30 pacientes em cada grupo.

30 A população com intenção de tratar incluiu todos os pacientes que foram aleatórios na semana 0 e receberam pelo menos 1 injeção da droga em estudo; esta população foi utilizada para a análise de eficácia. Todos os testes foram feitos em  $\alpha=0,05$ . Inserção dos não responsivos foi utilizada para todas as análises de eficácia; qualquer paciente com uma perda do índice de PASI ou AGM em qualquer visita foi considerado um não responsivo naquela visita. Para avaliar o impacto dos dados perdidos, análises de sensibilidade dos dados na semana 12 foram completadas utilizando o método da última observação realizada adiante. A análise primária da resposta PASI 75 na semana 12 foi feita utilizando a seguinte ordem sequencial para ajustar para multiplicidade: 200 mg semanalmente versus placebo,

200 mg cos versus placebo, 100 mg cos versus placebo, 200 mg x 4 versus placebo, e 200 mg x 1 versus placebo. A diferença de tratamento entre cada grupo tratado com ABT-874 e o grupo placebo para mudança da média de porcentagem no índice PASI foi avaliado utilizando análise de variância, com índice PASI de linha de base e grupo de tratamento como  
5 fatores. As análises de segurança foram conduzidas utilizando a população segura, que incluiu todos os pacientes que receberam pelo menos uma injeção da droga em estudo.

## II. Resultados

A. Pacientes: um total de 180 pacientes foram alistados aleatoriamente para 1 de 6 grupos de tratamento (Figura 1). A maioria dos pacientes (76,7% dos pacientes tratados  
10 com placebo e 98% de todos os pacientes do grupo de tratamento com ABT-874) completou a porção de 12 semanas do estudo.

Pacientes foram bem balanceados entre os grupos de tratamento com respeito às características demográficas e atividade da doença (tabela 1). Pacientes foram predominantemente machos (74,4%) e brancos (92,2%). Média de envolvimento ASC foi 25% e a média  
15 de índice PASI foi 18,8.

B. Eficácia: A porcentagem de pacientes alcançado o ponto primário de resposta PASI75 na semana 12 foi estatisticamente significativamente maior ( $p < 0,001$ ) em todos os grupos de tratamento com ABT-874 (200 mg x 63,3%, 19 de 30; 100 mg cos: 93,3%, 28 de 30; 200 mg x 4: 90,0%, 27 de 30; 200 mg cos: 93,3%, 28 de 30; 200 mg semanalmente:  
20 90,0% 27 de 30) comparados com placebo (3,3%, 1 de 30). Para a relativamente curta duração desta triagem, respostas PASI 75 em todos os grupos de tratamento ABT-874 foram similares com a exceção do grupo de tratamento 200 mg x 1 tratamento (Figura 2).

Uma análise do subgrupo por demografia (sexo, idade, raça, e peso), características da doença de base (história da artrite psoriática, ASC, e índice PASI), e terapia de base  
25 para psoríase dentro de 12 meses de receber o tratamento do estudo (biológico e não biológico sistêmico, tópico e fototerapia) demonstrou que os pacientes tratados com ABT-874 dentro de vários subgrupos consistentemente alcançaram altos níveis de resposta PASI 75 na semana 12.

Quase 100% dos grupos de dosagem ABT-874 mais altas chegaram a pelo menos  
30 uma resposta PASI 50 na semana 12 (200 mg x 1: 76,7%, 23 de 30; 100 mg cos: 100,0%, 30 de 30, 200 mg x 4: 96,7%, 29 de 30; 200 mg cos: 96,7%, 29 de 30; 200 mg semanalmente: 100,0%, 30 de 30; placebo: 16,7%, 5 de 30;  $p < 0,001$  para cada comparação com placebo). A porcentagem de pacientes que alcançaram pelo menos uma resposta PASI 90 na semana 12 foi estatisticamente significativamente melhor ( $p < 0,001$ ) em todos menos 1 (200 mg  
35 x1) dos grupos de tratamento ABT-874 quando comparados com placebo, como segue: 200 mg x1: 16,7%, 5 de 30; 100 mg cos: 53,3%, 16 de 30; 200 mg x4: 63,3%, 19 de 30; 200 mg cos: 76,6%, 23 de 30; 200 mg semanalmente: 53,3%, 16 de 30; e placebo: 0%, 0 de 30. Em

adição, na semana 12, significativamente mais ( $p < 0,001$ ) pacientes em todos os grupos de tratamento ABT-874 tiveram conquistadas uma taxa de AGM limpa ou mínima comparada com pacientes no grupo placebo, como segue: 200 mg x 50,0%, 15 de 30; 100 mg cos: 83,3%, 25 de 30; 200 mg x4: 73,3%, 22 de 30; 200 mg cos: 86,7%, 26 de 30; 200 mg semanalmente: 86,7%, 26 de 30; versus placebo: 3,3%, 1 de 30.

A porcentagem de pacientes alcançando o ponto primário da resposta PASI 100 na semana 12 foi estatisticamente significativamente maior ( $p < 0,001$ ) nos seguintes grupos de tratamento com ABT-874 (200 mg cos: 46,7%, 14 de 30; 200 mg semanalmente: 36,7%, 11 de 30, comparado com placebo (0%, 0 de 30).

Resposta ao ABT-874 foi rápida. A média de porcentagem melhorada nos índices PASI a partir da linha de base aumentou ao longo do tempo para todos os grupos de tratamento ABT-874 (Figura 3) e foram estatisticamente significativamente maiores para cada grupo de tratamento ABT-874 comparado como placebo em cada ponto ( $p < 0,001$ , exceto para o grupo 100 mg cos na semana 1,  $p = 0,023$ ).

C. Segurança: Terapia com ABT-874 foi geralmente bem tolerada (Tabela 2). Um paciente (0,7%) tratado com ABT-874 descontinuou o estudo devido a uma descoloração localizada na pele; 2 (6,7%) pacientes tratados com placebo descontinuaram o estudo, 1 por artropatia psoriática e 1 por câncer de ovário. Dois (1,1%) pacientes experimentaram sérios efeitos adversos (EAs); 1 paciente tratado com placebo foi diagnosticado com câncer de ovário no dia 37, e 1 paciente tratado com ABT-874 (200 mg, x1) foi diagnosticado com costondrite no dia 10. Nenhum paciente experimentou infarto do miocárdio ou cerebral, e não houve mortes.

Pacientes recebendo qualquer dose de ABT-874 foram significativamente ( $0 = 0,033$ ) mais provavelmente que pacientes recebendo placebo para experimentar um AE pelo menos possivelmente relacionado a droga de estudo (ABT-874: 36,0%, 54 de 150; placebo: 10,0%, 3 de 30; tabela 2); a maioria desses EAs foram relacionados ao sítio de injeção (reação no sítio de injeção, eritema, prurido ou irritação).

A maioria dos EAs foi leve (EAs leves ocorreram em 46,0% [69 de 150] de pacientes tratados com ABT-874 e 30,0% [9 de 30] paciente tratados com placebo). O AE mais comum foi reação no local de injeção, ocorrendo em 16,7% (25 de 150) dos pacientes tratados com qualquer dose de ABT-874 (nenhum relato de reações no sítio de injeção para pacientes tratados com placebo;  $p = 0,028$ , tabela 3). Não existiram diferenças estatisticamente significantes entre as incidências de outros EAs em pacientes tratados com ABT-874 comparados com pacientes tratados com placebo. Os próximos mais frequentemente EAs reportados foram nasofaringite e infecção do trato respiratório superior.

EAs infecciosos foram reportados por 32,8% (59 de 180) de todos os pacientes (placebo: 23,3%, 7 de 30; todos os pacientes tratados com ABT-874, 34,7%, 52 de 150). Os

EAs infecciosos mais comuns reportados para qualquer grupo de tratamento ABT-874 foram nasofaringite (12,0%, 18 de 150), infecção do trato respiratório superior (10,7%, 16 de 150), e bronquite e infecção viral (ambos 2,7%, 4 de 150). Nenhum EAs sério foi reportado.

5 Dois pacientes reportaram malignâncias durante o estudo. Um paciente tratado com placebo foi diagnosticado com câncer de ovário, que foi ocorrido como dia 129. Um paciente tratado com ABT-874 (200 mg x4) foi diagnosticado com um câncer de pele não melanoma (carcinoma celular escamoso) que foi removido no dia 133. O histórico médico para estes pacientes incluíram remoção de um crescimento de pele benigno em Março de 2005.

10 Não houve hematologia clinicamente significativa, químico (incluindo concentrações de glicosa sanguínea), ou mudanças de sinais vitais comparados com placebo.

Tabela 1: Linha base demográfica e características clínicas

Característica	Grupo Tratamento						Todas ABT-874 N=150
	200 mg x 1	100 mg eow	200 mg x 4	200 mg eow	200 mg semanalmente	200 mg	
Placebo	N=30	N=30	N=30	N=30	N=30	N=30	
Idade, y	49±14.4	52±12.0	45±13.8	43±13.8	44±16.0	46±14.0	46±14.1
Macho, No. (%)	22 (73.3)	23 (76.7)	22 (73.3)	21 (70.0)	23 (76.7)	23 (76.7)	112 (74.7)
Branco, No. (%)	28 (93.3)	25 (83.3)	28 (93.3)	27 (90.0)	30 (100.0)	28 (93.3)	138 (92.0)
Peso, kg	89±17.6	94±21.2	94±17.9	92±27.8	93±24.1	95±18.0	94±21.9
Duração de psoríase, y	21±12.4	20±13.2	24±14.6	22±14.2	18±11.5	18±10.9	21±13.0
Índice PASI	16±2.9	18±6.7	20±6.3	20±7.6	20±6.2	19±6.3	19±6.6
ASC afetado, %	21±9.2	24±13.6	28±15.7	24±13.0	29±16.8	23±12.6	26±14.5
AGM, No. (%)							
Leve	1 (3.3)	0	0	0	0	0	0
Moderado	20 (66.7)	19 (63.3)	17 (56.7)	13 (43.3)	15 (50.0)	17 (56.7)	81 (54.0)

Severa	9 (30.0)	11 (36.7)	12 (40.0)	14 (46.7)	13 (43.3)	11 (36.7)	61 (40.7)
História de PsA, No. (%)	9 (30.0)	7 (23.3)	12 (40.0)	9 (30.0)	6 (20.0)	9 (30.0)	43 (28.7)
Tratamento prévio de psoríase,*							
No. (%)							
Terapia Tópica	19 (63.3)	21 (70.0)	26 (86.7)	15 (50.0)	21 (70.0)	23 (76.7)	106 (70.7)
Fototerapia	1 (3.3)	6 (20.0)	4 (13.3)	4 (13.3)	3 (10.0)	5 (16.7)	22 (14.7)
Não biológico sistêmico	6 (20.0)	4 (13.3)	7 (23.3)	5 (16.7)	6 (20.0)	8 (26.7)	30 (20.0)
Biológico sistêmico	3 (10.0)	3 (10.0)	7 (23.3)	6 (20.0)	4 (13.3)	7 (23.3)	27 (18.0)

Valores são média±DP a menos que notado de outra forma. \*Dentro dos 12 meses anteriores para estudar o tratamento. ASC=área de superfície corporal; cos = cada outra semana; PASI= área psoriática e índice de severidade; AGM=avaliação global do médico; PsA=artrite psoriática

Tabela 2: Resumo dos eventos adversos emergentes do tratamento clínico

Evento	Grupo Tratamento						Todas ABT-874 N=150
	200 mg × 1 N=30	100 mg eow N=30	200 mg × 4 N=30	200 mg eow N=30	200 mg semalmente N=30	200 mg N=30	
Qualquer EA	18 (60.0)	22 (73.3)	21 (70.0)	21 (70.0)	19 (63.3)	101 (67.3)	
Qualquer EA pelo menos possivelmente relacionado à droga*	3 (10.0)	12 (40.0)	14 (46.7)	11 (36.7)	8 (26.7)	54 (36.0)	
Qualquer EA severo	3 (10.0)	0	0	0	1 (3.3)	2 (1.3)	
Qualquer EA sério*	1 (3.3)	0	0	0	0	1 (0.7)	
Qualquer EA levando a Descontinuação da droga estudo	2 (6.7)	0	0	0	0	1 (0.7)	
Qualquer EA pelo menos possivelmente Relacionado à droga* e sério	0	0	0	0	0	0	
Qualquer EA infeccioso	7 (23.3)	9 (30.0)	13 (43.3)	13 (43.3)	10 (33.3)	52 (34.7)	



Qualquer EA infeccioso sério	0	0	0	0	0	0	0
Qualquer neoplasma malign	1 (3.3)	0	0	1 (3.3)	0	0	1 (0.7)
Mortes	0	0	0	0	0	0	0

\*Como avaliado pelo investigador. †Eventos adversos sérios incluíram o seguinte: qualquer evento que resultou em morte; qualquer evento que foi comprometedor da vida; qualquer evento que resulta na admissão para o hospital para qualquer comprimento de tempo; qualquer evento que ocorreu enquanto o paciente foi hospitalizado e resultou no prolongamento da estadia no hospital; qualquer evento que resultou na persistência ou desabilidade/incapacidade significante; ou qualquer evento médico importante que requer intervenção médica ou cirúrgica para prevenir um resultado mais sério. EA=evento adverso; cos=cada outra semana.

Tabela 3: eventos adversos emergentes do tratamento com uma incidência  $\geq 5\%$  em qualquer em qualquer grupo por frequência descendendo de pacientes tratados com qualquer dose de ABT-874

Evento	Grupo Tratamento						Todos
	200 mg x 100 mg	200 mg x 200 mg	4 eow	200 mg eow	200 mg semanal	ABT-874	
	Placebo N=30	100 mg N=30	4 N=30	200 mg N=30	200 mg N=30	200 mg semanal N=30	N=150
	0	2 (6.7)	7 (23.3)	5 (16.7)	7 (23.3)	4 (13.3)	25 (16.7)
Reação no sítio de injeção	1 (3.3)	4 (13.3)	4 (13.3)	3 (10.0)	2 (6.7)	5 (16.7)	18 (12.0)
Nasofaringite	2 (6.7)	2 (6.7)	4 (13.3)	3 (10.0)	5 (16.7)	2 (6.7)	16 (10.7)
Infecção do trato respiratório superior	2 (6.7)	5 (16.7)	0	1 (3.3)	3 (10.0)	2 (6.7)	11 (7.3)
Dor de cabeça	0	0	1 (3.3)	2 (6.7)	2 (6.7)	2 (6.7)	7 (4.7)
Prurido no sítio de injeção	0	0	0	4 (13.3)	2 (6.7)	1 (3.3)	7 (4.7)
Eritema no sítio de injeção	0	1 (3.3)	3 (10.0)	2 (6.7)	0	0	6 (4.0)
Irritação no sítio de injeção	0	2 (6.7)	2 (6.7)	0	0	1 (3.3)	5 (3.3)
Fadiga	0	1 (3.3)	0	0	1 (3.3)	2 (6.7)	4 (2.7)
Dor na extremidade							

Artralgia	0	2 (6.7)	0	0	0	0	2 (6.7)	4 (2.7)
Infecção Viral	0	0	0	2 (6.7)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	4 (2.7)
Bronquite	0	1 (3.3)	0	1 (3.3)	2 (6.7)	2 (6.7)	0	4 (2.7)
Náusea	1 (3.3)	0	3 (10.0)	0	0	0	0	3 (2.0)
Otite Externa	0	0	0	0	2 (6.7)	2 (6.7)	0	2 (1.3)
Vômito	1 (3.3)	0	0	2 (6.7)	0	0	0	2 (1.3)
Infecção do Trato Urinário	2 (6.7)	1 (3.3)	0	1 (3.3)	0	0	0	2 (1.3)
Herpes simplex	0	0	2 (6.7)	0	0	0	0	2 (1.3)
Injúria de membros	0	2 (6.7)	0	0	0	0	0	2 (1.3)
Prurido	2 (6.7)	0	0	0	0	0	0	0

\*Como avaliado pelo investigador

### III. Conclusão

A triagem de fase II, multicentro, aleatória, duplo-cega, controlada com placebo descrita neste Exemplo demonstrou estatisticamente e clinicamente significância de eficácia do ABT-874 no tratamento de placa psoriática crônica moderada a severa. Com a excessão do grupo de tratamento ABT-874 200 mg x 1, 90% ou mais de pacientes em todos os grupos de tratamento com ABT-874 alcançaram PASI 75 ou maior na semana 12, comparado com 3,3% de pacientes tratados com placebo. Mesmo no grupo que recebeu somente 1 dose da droga de estudo (200 mg x1), uma maioria (63,3%) de pacientes alcançara pelo menos PASI 75 na semana 12. Em adição, quase 100% dos pacientes tratados com ABT-874 alcançaram PASI 50 ou mais, que é considerado ser uma melhora clínica significativa (Carlin CS, Feldman SR, Jrueger JG, Menter A, Krueger GG. J Am Acad Dermatol 2004; 50: 859-66) na semana 12. Os resultados para outros pontos secundários tais como PASI 90 e AGM de limpo a mínimo, foram consistentes com e deu suporte a análise de eficácia primária.

Resposta ao ABR-874 foi rápida. Separação estatisticamente significativa entre pacientes tratados com placebo- e ABT-874 ocorreu tão precoce como na semana 1 para a média de porcentagem de melhoria nos índices PASI. Melhoria foi sustentada pelas 12 semanas de duração da triagem, mesmo para pacientes nos grupos de dosagem ABT0874 200 mg x1 e 200 mg x4.

ABT-874 foram bem tolerados, e mais EAs foram leves. Embora pacientes tratados com ABT-874 foram significativamente mais provavelmente para experimentar um AE pelo menos possivelmente relacionado a droga de estudo, a maioris desses foram EAs relacionados ao sítio de injeção (reação ao sítio de injeção, eritema, prurido, ou irritação). Não existe associação entre uma dose aumentada do ABT-874 e uma incidência aumentada de EAs. DE nota, não existiu infartos do miocárdio ou cerebral.

Eventos imunológicos relacionados são de particular interesse para pacientes recebendo anticorpos anti-IL-12/23. Os mais frequentes EAs infecciosos relatados foram nasofaringite, infecção do trato respiratório superior, bronquite, e infecção viral. Não existiu EAs infecciosos sérios relatados durante a duração desta triagem. Das 2 malignâncias diagnosticadas durante o estudo, câncer de ovário foi diagnosticado em um paciente tratado com placebo, e câncer de pele não melanoma foi diagnosticado em um paciente tratado com ABT-874 que tinha uma história de um crescimento de pele benigno.

Em resumo, ABT-874 demonstrou benefício estatisticamente e clinicamente significativa para o tratamento de pacientes com placa psoriática crônica moderada a severa e foi bem tolerado.

Exemplo 5: Manutenção de Resposta com o Anticorpo Monoclonal Inteiro IL-12/IL-23 Humano, ABT-874, No Tratamento de Placa Psoriática Moderada a Severa

A eficácia e segurança do ABT-874 foram avaliadas na semana 12, Fase II, em tri-

agem controlada e aleatória e 36 semanas de fase de acompanhamento. O objetivo do seguinte exemplo foi analisar a manutenção da resposta seguindo a descontinuação de terapia durante a segunda semana 12 desta Fase II das injeções subcutâneas do ABT-874 no tratamento da placa Ps moderada a severa.

5           Adultos com Ps afetando  $\geq 10\%$  de área de superfície corporal (ASC) e um índice PASI  $\geq 12$  foram eleitos para este estudo de 12 semanas, duplo-cego, controlado por placebo. Pacientes foram aleatoriamente para 1 de 6 braços:

- 1) 100 mg de ABT-874 a cada outra semana (cos) por 12 semanas;
- 2) uma dose de 200 mg de ABT-874 na semana 0;
- 10       3) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 4 semanas;
- 4) 200 mg de ABT-874 cos por 12 semanas;
- 5) 200 mg de ABT-874 a cada semana por 12 semanas; ou
- 6) placebo.

15           O ponto primário foi uma resposta  $\geq \text{PASI}75$  na Semana 12. Pacientes que encontraram o ponto primário entraram na fase cega/re-tratamento na semana 36. Tratamento com a droga de estudo foi descontinuado, e pacientes foram monitorados para índice PASI em vários tempos durante as 36 semanas que se seguiram ao período, para respostas PASI 50, PASI 75 e PASI 90. Manutenção da resposta PASI foi avaliada até a Semana 24.

20           Um total de 180 pacientes participou do estudo, 30 em cada braço. Características de base foram similares entre braços (valores são média exceto % macho): idade, 46 anos, 74% machos; 21 anos duração Ps; PASI19; e 25% de ASC afetado.

25           Na semana 12, as porcentagens de pacientes com  $\geq \text{PASI}75$  foram estatisticamente significativamente maior para pacientes em cada um dos 5 braços ABT-874 vs. Placebo (Tabela 4). Na semana 24, porcentagens substanciais de responsivos ao PASI 75 nos braços de tratamentos ativos mantiveram pelo menos um índice PASI de PASI  $\geq 50$ . Ainda, porcentagens substanciais de responsivos PASI 75 nos braços de tratamentos ativos tiveram também mantiveram pelo menos um índice PASI de  $\geq \text{PASI}75$ , bem como um índice PASI de  $\geq \text{PASI}90$  (Tabela 4 e Figuras 4A-C). A porcentagem de pacientes mantendo uma resposta PASI 75 ao longo do tempo durante o período de 24 semanas é revelado na Figura

30       4D.

Tabela 4: Eficácia Semanal do ABT-874

	≥PASI 75 na semana 12	Manutenção da resposta ≥PASI 50: Semana 24 vs. Semana 12	Manutenção da resposta ≥PASI 75 Semana 24 vs. Semana 12	Manutenção da resposta ≥PASI 90 Semana 24 vs. Semana 12
100 mg cos por 12 semanas	93%*	71%	60%	33%
200 mg, uma dose	63%*	68%	23%	7%
200 mg cada semana por 4 semanas	90%*	82%	60%	23%
200 mg cos por 12 semanas	93%*	89%	73%	53%
200 mg cada semana por 12 semanas	90%*	85%	83%	57%
Placebo	3%	—	7%	7%

\*p<0.001 vs. placebo, NRI.

Em conclusão, ABT-874 foi significativamente mais eficaz que placebo no tratamento de placa Pd moderado a severa. Porcentagens substanciais de PASI 75 responsivos mantiveram uma resposta de ≥PASI 50, ≥PASI 75, e ≥PASI 90 na semana 24, seguindo a descontinuação da terapia ativa.

#### EQUIVALENTES

Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar utilizando não mais que experimentação de rotina, muitos equivalentes para modalidades específicas da invenção descritas aqui. Tais equivalentes são tencionados serem compreendidos pelas seguintes reivindicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender os passos de:

(i) selecionar um paciente que esteja sofrendo de psoríase crônica; e

5 (ii) administrar ao paciente um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase crônica no paciente.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente tem tido um diagnóstico clínico de psoríase por pelo menos 6 meses.

10 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o referido paciente tem tido placa psoriática estável por pelo menos 2 meses.

4. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender os passos de:

15 (i) selecionar um paciente que não tenha tido uma condição selecionada a partir do grupo consistindo de prévia exposição à terapia anti-IL-12 sistêmica ou biológica; psoríase não em placa; inabilidade de descontinuar terapias tópicas de psoríase pelo menos 2 semanas antes do tratamento; fototerapia de luz ultravioleta B pelo menos 2 semanas antes do tratamento; fototerapia de luz ultravioleta-psoraleno pelo menos 4 semanas antes do tratamento; terapias sistêmicas pelo menos 4 semanas antes do tratamento; terapias biológicas

20 pelo menos 12 semanas antes do tratamento; ingestão requerida de corticosteróides orais ou injetáveis durante o tratamento; uma exacerbação da asma requerendo hospitalização nos 10 anos anteriores à seleção; uma infecção ou fatores de risco para infecção severa; uma história de malignâncias outra que carcinoma celular basal tratado com sucesso; e uma história de reação imunológica principal para um agente contendo imunoglobulina G; e

25 (ii) administrar ao paciente um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase no paciente.

5. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender os passos de:

30 (i) selecionar um paciente que não tenha tido vacinação com um agente viral vivo dentro de 1 mês; e

(ii) administrar a um paciente um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23; assim tratando psoríase no paciente.

35 6. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender os passos de:

(i) administrar um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é ca-

paz de se ligar a um epítopo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23 a um paciente,

(ii) monitorar o paciente para um resultado laboratorial anormal clinicamente significativo selecionado a partir do grupo consistindo de aspartato transaminase ou alanina transaminase > 5 vezes o limite superior do normal; bilirrubina total sérica > 3 vezes o limite superior do normal; creatinina sérica > 3 vezes o limite superior do normal; creatinina fosfoquinase > 5 vezes o limite superior do normal; hemoglobina < 8 g/dL; contagem de célula sanguínea branca <  $2 \times 10^9/L$ ; e contagem de plaqueta <  $75 \times 10^9/L$ ;

(iii) administração descontinuada do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, em um paciente em que o resultado laboratorial anormal clinicamente significativo é detectado;

assim tratando psoríase no paciente.

7. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

8. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

9. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 200 mg.

10. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg.

11. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é capaz de se ligar ao epítopo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligada à subunidade p35 da IL-12.

12. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é capaz de se ligar ao epítopo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligada à subunidade p19 da IL-23.

13. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é capaz de se ligar ao epítopo da subunidade p40 quando a subunidade p40 está ligada à subunidade p35 da IL-12 e quando a subunidade p40 está ligada a uma subunidade p19 da IL-23.

14. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 1-3, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase crônica é placa psoriática crônica.



15. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 4-6, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase crônica é placa psoriática crônica.

5 17. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 90 por um período prolongado seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, assim tratando  
10 psoríase no paciente.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o período prolongado é pelo menos 12 semanas.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

15 20. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

21. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é administrado em uma dose única.

22. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que  
20 o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 200 mg.

23. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg.

25 24. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

25. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23 ao  
30 paciente, em que o paciente mantém uma taxa de AGM limpa ou mínima por um período prolongado seguindo administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, assim tratando psoríase no paciente.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o período prolongado é pelo menos cerca de 12 semanas.

35 27. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

28. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que

o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

29. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose única.

5 30. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 200 mg.

31. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg.

10 32. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

33. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítipo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23 ao  
15 paciente, em que o paciente exibe um índice PASI aumentado por cerca de 8 semanas seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, assim tratando psoríase no paciente.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente exibe um índice PASI aumentado por cerca de 4 semanas seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.  
20

35. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente exibe um índice PASI aumentado por cerca de 2 semanas seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.

36. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que  
25 o paciente exibe um índice PASI aumentado por cerca de 1 semana seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo.

37. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

38. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que  
30 o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

39. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose única.

40. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de  
35 cerca de 200 mg.

41. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de

cerca de 100 mg.

42. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

43. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítopo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 100 por um período prolongado seguindo a administração inicial do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, assim tratando psoríase no paciente.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o período prolongado é pelo menos cerca de 12 semanas.

45. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

46. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

47. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 200 mg.

48. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

49. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítopo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 50 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, assim tratando psoríase no paciente.

50. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítopo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 75 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno, assim tratando psoríase no paciente.

51. Método de tratar psoríase em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração ao paciente de um anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, que é capaz de se ligar a um epítopo da subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23, em que o paciente mantém pelo menos uma resposta PASI 90 por um período prolongado seguindo a descontinuação da administração do anticorpo, ou porção ligadora de antígeno,

assim tratando psoríase no paciente

52. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o período prolongado é pelo menos cerca de 12 semanas.

5 53. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é administrado por pelo menos cerca de 12 semanas.

10 54. Método, de acordo com quaisquer reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado quinzenalmente.

55. Método, de acordo com quaisquer reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado semanalmente.

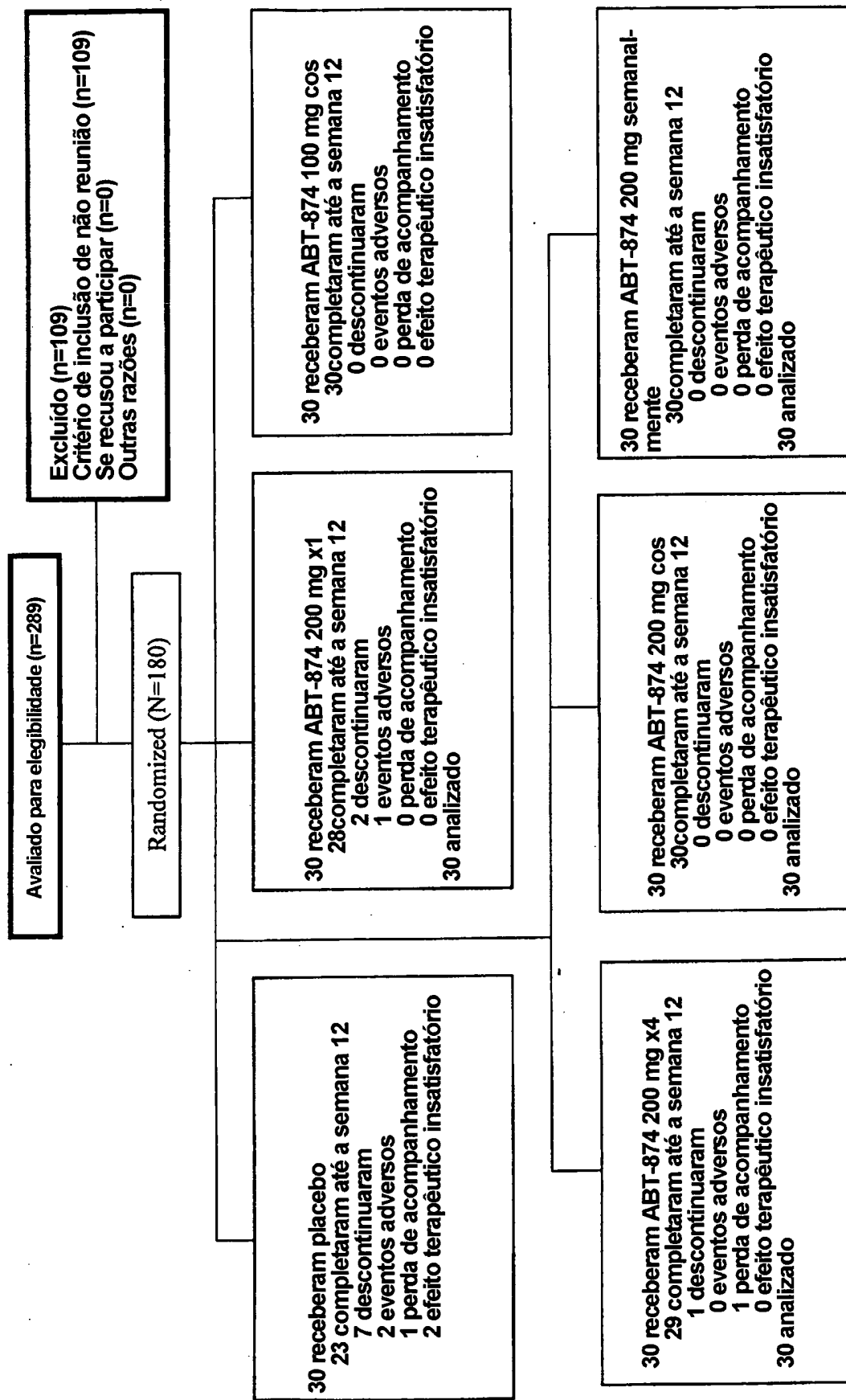
15 56. Método, de acordo com quaisquer reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose única.

57. Método, de acordo com quaisquer reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 200 mg.

20 58. Método, de acordo com quaisquer reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo, ou porção ligadora de antígeno do mesmo, é administrado em uma dose de cerca de 100 mg.

59. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 49-51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a psoríase é psoríase crônica.

25 60. Método de tratar psoríase em um paciente, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração de um anticorpo direcionado contra a IL-12 humana e IL-23 humana para o paciente em um regime de dose quinzenal, tal que a psoríase é tratada.



*Fig. 1*

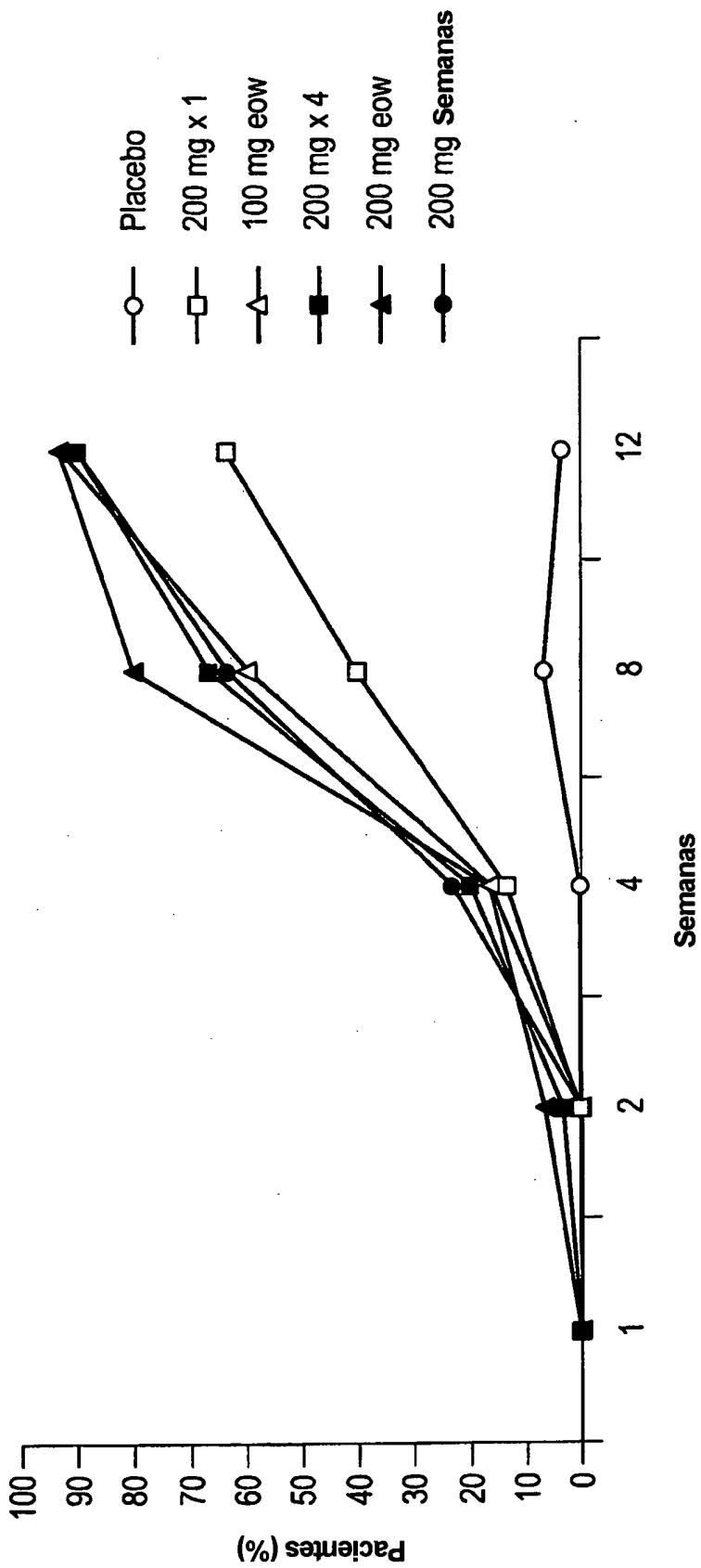


Fig. 2

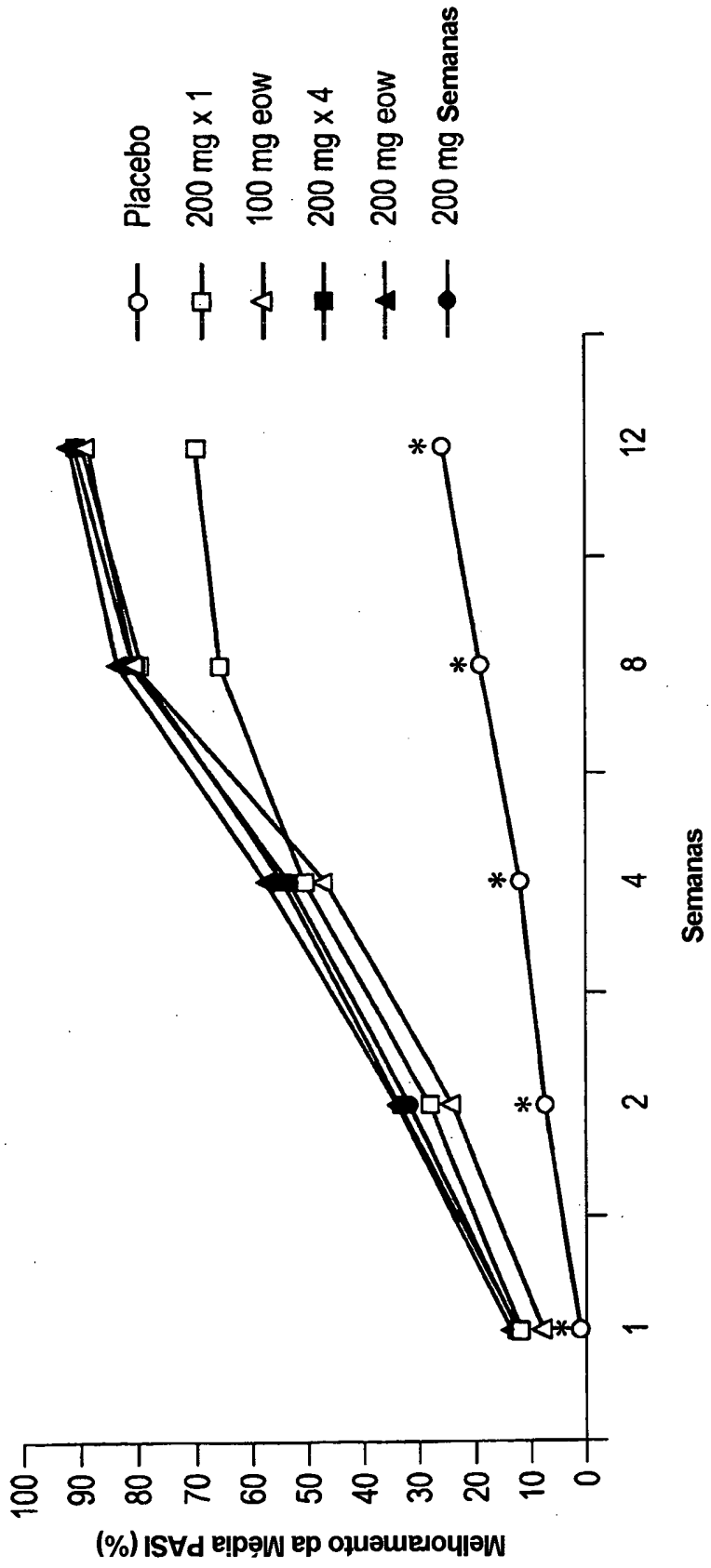
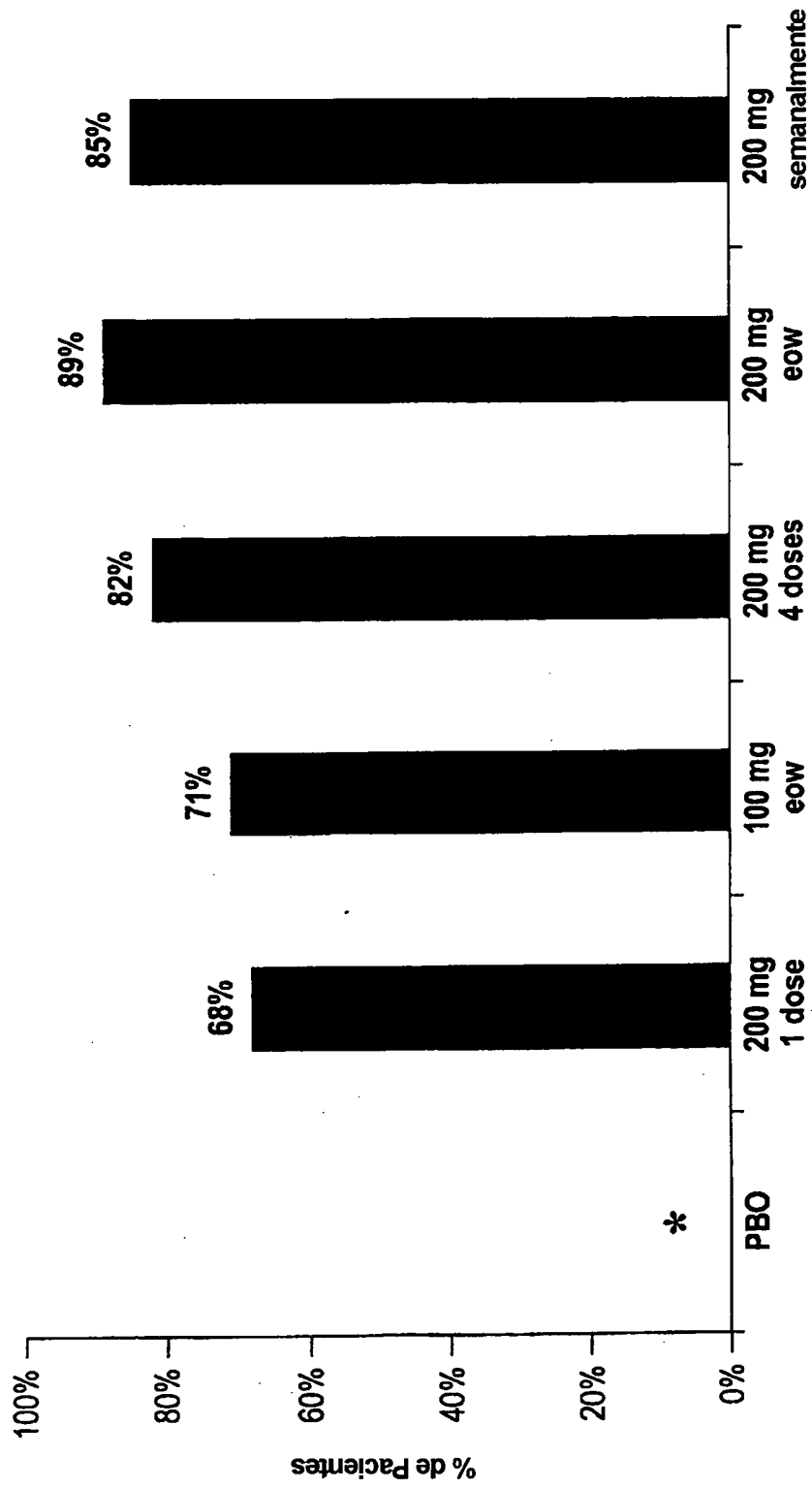


Fig. 3

Porcentagem de Responsivos ao PASI 75 na semana 12 que Mantiveram Reposta ? PASI 50 na Semana 24

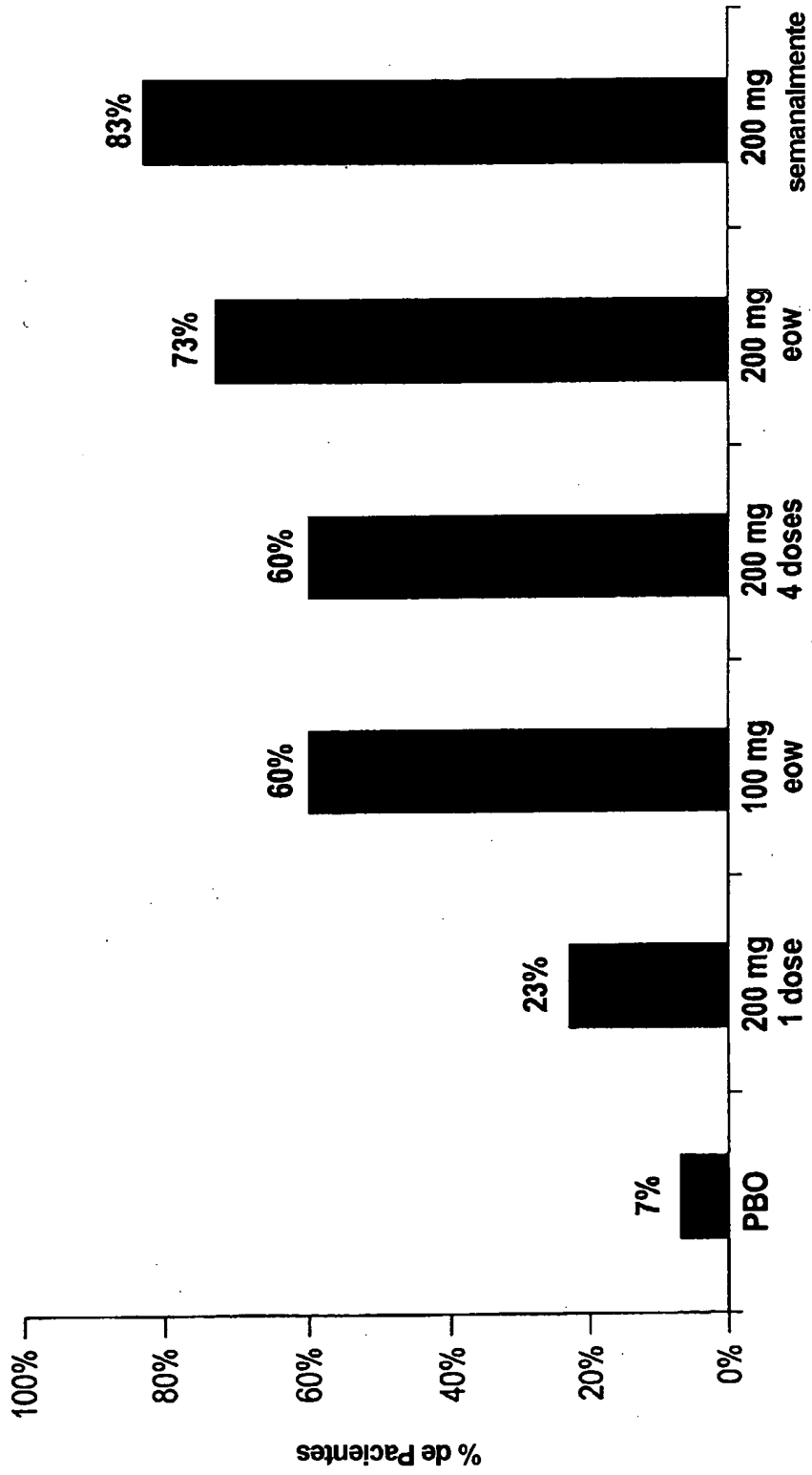


\* 1 de 1 paciente no grupo placebo que foi um responsivo PASI 75 na semana 12 manteve uma resposta PASI 50 na semana 24 seguindo a descontinuação do placebo na semana 12

Fig. 4A



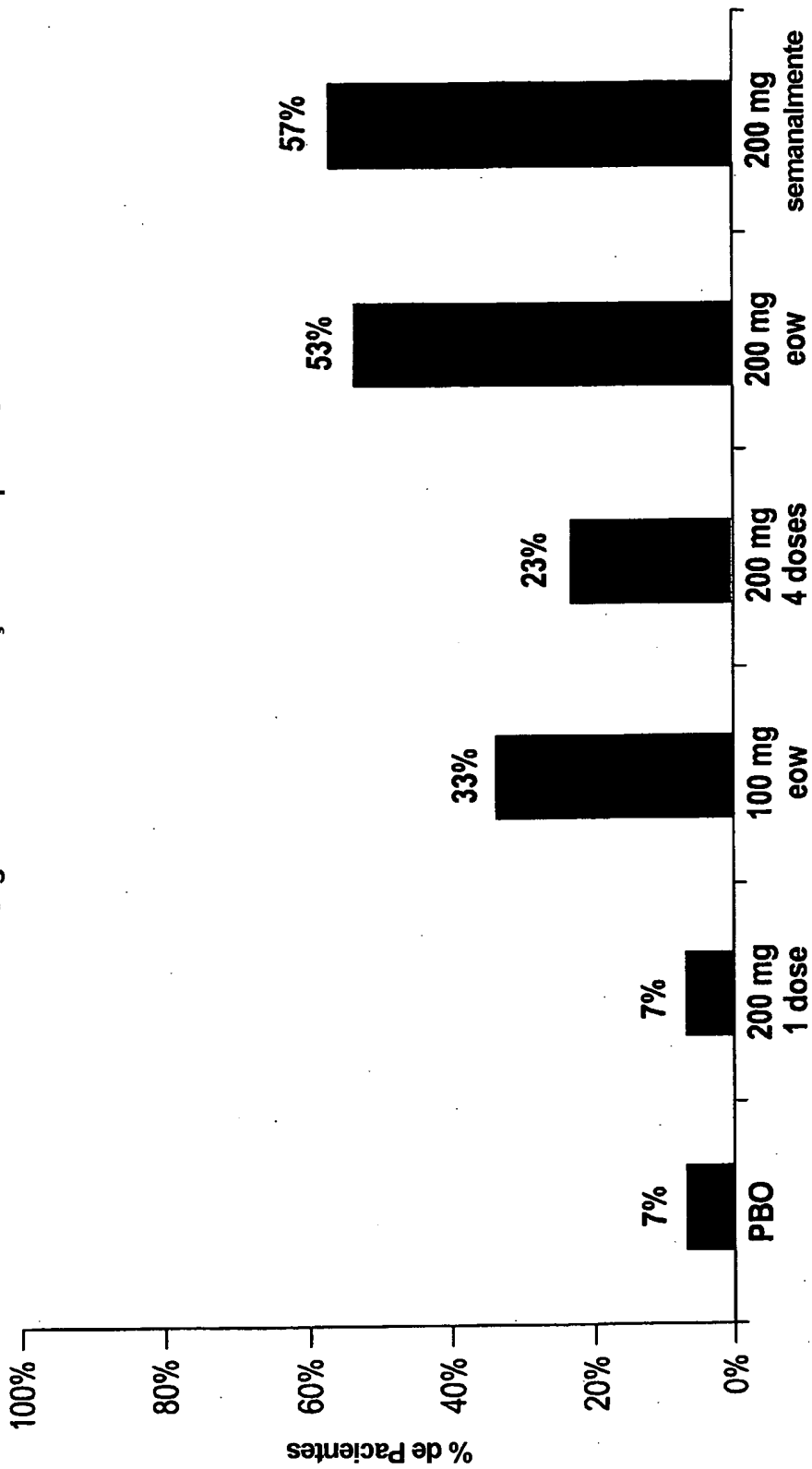
PASI 75 na Semana 24 Seguindo Descontinuação da Terapia na Semana 12



ITT-NRI.

*Fig. 4B*

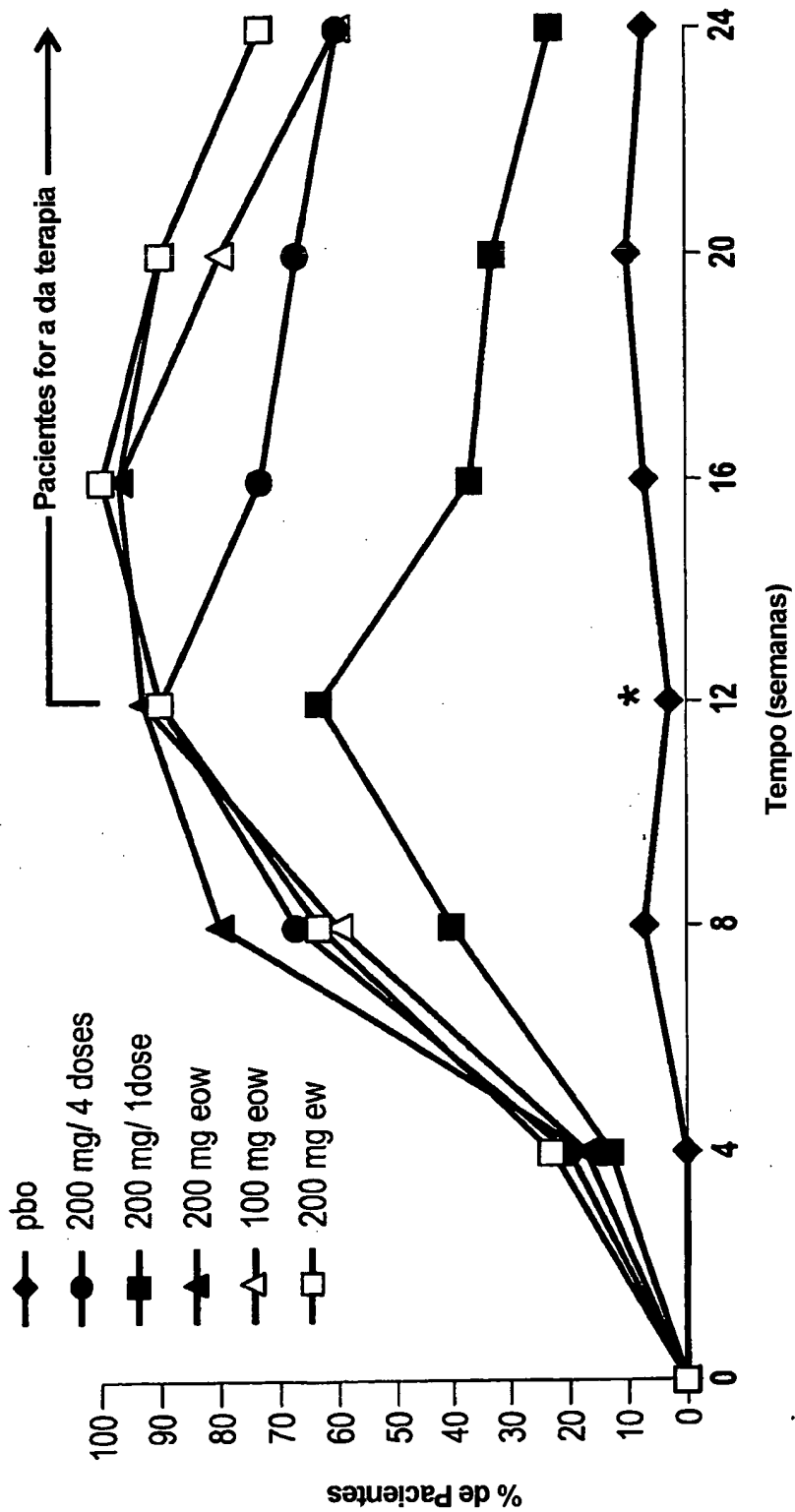
PASI 90 na Semana 24 Seguindo Descontinuação da Terapia na Semana 12



ITT-NRI.

Fig. 4C

Curso Temporal do Melhoramento PASI 75



NRI.

\*p<0,001 para todo tratamento ativo  
Braços vs. placebo

Fig. 4D

PJ0806605 - 1

RESUMO

"MÉTODOS PARA TRATAR PSORÍASE"

A invenção provê um método de tratar psoríase em um paciente por administração a um paciente de um anticorpo capaz de se ligar á subunidade p40 da IL-12 e/ou IL-23.