



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0620648-4 B1



(22) Data do Depósito: 20/12/2006

(45) Data de Concessão: 20/12/2022

(54) Título: VARIANTE DE IL-12 P40, PROTEÍNAS IL-12, IL-23 E DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA

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

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2005 US 60/755,382.

(73) Titular(es): MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG.

(72) Inventor(es): GORDON D. WEBSTER; SUZANNE P. MCKENZIE; KIN-MING LO; PASCAL ANDRÉ STEIN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2006012301 de 20/12/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/076933 de 12/07/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/06/2008

(57) Resumo: VARIAÇÃO DE UM DOMÍNIO D3 DA INTERLEUCINA-12P40, PROTEÍNA IL-12 OU UM FRAGMENTO DA MESMA, PROTEÍNA DE FUSÃO, ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR DE EX-PRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MES-MA. A presente invenção refere-se a polipeptídeos interleucina-12(IL-12) p40 modificados. Os polipeptídeos modificados possuem alterações na subunidade IL-12p40 para eliminar o sítio de protease entre as posições Lys260 e Arg261. Os polipeptídeos IL-12p40 modificados de acordo com a invenção possuem maior estabilidade comparada com a dos polipeptídeos IL-12p40 humanos maduros do tipo selvagem.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"VARIANTE DE IL-12 P40, PROTEÍNAS IL-12, IL-23 E DE FUSÃO,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DA MESMA".**

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se, de forma geral, a proteínas IL-12p40, incluindo proteínas de fusão contendo IL-12p40, modificadas para aumentar a sua estabilidade. Em particular, as proteínas IL-12p40 da invenção removem um sítio proteolítico na região de Lys260 e de Arg261 na subunidade p40.

Fundamento da Invenção

[002] A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina inflamatória que é produzida em resposta à infecção por uma variedade de células do sistema imunológico, incluindo células fagocíticas, células B e células dendríticas ativadas (Colombo e Trinchieri (2002), Cytokine & Growth Factor Reviews, 13: 155-168). A IL-12 desempenha uma função essencial na mediação da interação dos instrumentos de defesa inatos e adaptativos do sistema imunológico, atuando sobre células T e células "natural killer" (NK), aumentando a proliferação e a atividade de linfócitos citotóxicos e a produção de outras citocinas inflamatórias, especialmente interferon-γ (IFN-γ).

[003] A IL-12 é uma molécula heterodimérica composta de uma cadeia α (a subunidade p35, IL-12p35) e uma cadeia β (a subunidade p40, IL-12p40) ligadas covalentemente através de uma ponte dissulfeto para formar um heterodímero de 74 kDa biologicamente ativo. As sequências de aminoácidos de IL-12p35 e IL-12p40 de uma IL-12 humana madura (do tipo selvagem) são apresentadas nas figuras 1 (SEQ ID NO: 1) e 2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

[004] A interleucina-23 (IL-23) é uma molécula heterodimérica com ponte de dissulfeto intimamente relacionada à IL-12, no fato de que possui a mesma cadeia β IL-12p40 que a da IL-12, mas um uma

única cadeia α (a subunidade p19, IL-23p19) (Oppmann e outros, (2000), *Immunity*, 13: 715-725). Como a IL-12, a IL-23 é produzida por células fagocíticas e células dendríticas ativadas e acredita-se que esteja envolvida no recrutamento e na ativação de uma faixa de células inflamatórias (Langrish e outros, (2004) *Immunol. Rev.*, 202: 96-105). A sequência de aminoácidos de IL-23p19 de uma IL-23 humana madura é representada na figura 3 (SEQ ID NO: 3).

[005] Para as células imunológicas secretarem heterodímeros de IL-12 ou de IL-23 biologicamente ativos, é necessária a expressão concomitante das subunidades α e β na mesma célula. A secreção por células imunológicas da IL-12p35 ou da IL-23p19 isoladamente não foi observada, enquanto que as células que produzem o heterodímero de IL-12 ou de IL-23 biologicamente ativo secretam a subunidade p40 na forma livre em um excesso de 10 até 100 vezes em relação ao heterodímero (D' Andrea e outros (1992), *J. Exp. Med.*, 176: 1387-98, Oppmann e outros, (2000), *Immunity*, 13: 715-725). Em adição, foi observado no camundongo que, mesmo na ausência da subunidade α , as células podem produzir um homodímero de IL-12p40 biologicamente ativo (Hikawa e outros (2004), *Neuroscience*, 129: 75-83).

[006] Foi mostrada que a presença de IL-12 endógena era necessária para a resistência imunológica a um amplo arranjo de agentes patogênicos, assim como a tumores transplantados ou quimicamente induzidos (Gateley e outros (1998), *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 495-521). Foi demonstrado que a IL-12 possui uma atividade antitumor potente baseada na indução de IFN- γ e na ativação de células efetoras tais como células T CD8+ e células NK (Brunda e outros (1993), *J. Exp. Med.*, 178: 1223-30). Como um resultado desta atividade antitumor demonstrada, a IL-12 foi testada em testes clínicos com seres humanos como um agente imunoterapêutico para o tratamento de uma

ampla variedade de cânceres (Atkins e outros (1997), Clin. Cancer Res., 3: 409-17; Gollob e outros (2000), Clin. Cancer Res., 6: 1678-92; e Hurteau e outros (2001), Gynecol. Oncol., 82: 7-10), incluindo câncer renal, câncer de colón, câncer ovariano, melanoma e linfoma de células T e como um adjuvante para vacinas para câncer (Lee e outros (2001), J. Clin. Oncol. 19: 3836-47).

[007] Para IL-12 ou IL-23, a produção da proteína recombinante em sua forma heterodimérica corretamente dobrada e biologicamente ativa, requer a expressão concorrente tanto da subunidade α quanto de IL-12p40 na linhagem de células produtora. A proteína recombinante purificada, entretanto, exibe um grau de heterogeneidade resultante da clivagem proteolítica na região C-terminal da IL-12p40. A instabilidade da proteína IL-12 ou IL-23 pode dar origem a problemas em sua produção e uso clínico como um agente terapêutico. Portanto, há uma necessidade na técnica de variantes de IL-12 ou de IL-23 recombinantes melhoradas que produzem uma proteína homogênea mais resistente à clivagem proteolítica.

Sumário da Invenção

[008] A invenção fornece variantes de subunidades p40 da IL-12 humana (variantes p40) que possuem maior estabilidade comparada com a das proteínas p40 da IL-12 do tipo selvagem. Nestas variantes de p40, a região C-terminal, que é normalmente sensível à clivagem proteolítica, foi engenheirada para ser mais resistente à digestão pelas proteases. Especificamente, as variantes de p40 da invenção incluem alterações de aminoácidos engenheiradas no domínio D3 direcionadas para evitar a criação de epítópos potenciais de células T que poderiam tornar as proteínas variantes imunogênicas e ativar respostas de anticorpos em seres humanos. Como um resultado, as variantes de p40 da invenção possuem melhores propriedades como agentes

terapêuticos em relação às proteínas IL-12p40 do tipo selvagem referentes a sua produção, formulação e farmacocinética.

[009] Consequentemente, em um aspecto, a invenção fornece uma variante de um domínio D3 de p40 da IL-12 humana (variante D3), em que a variante D3 possui pelo menos 85% de identidade com o domínio D3 da IL-12p40 humana do tipo selvagem e inclui uma alteração de aminoácido em uma ou mais posições correspondentes aos resíduos 258-266 da p40 da IL-12 humana madura. Certas modalidades da invenção se baseiam, em parte, em uma consideração de que uma alteração ou alterações de aminoácidos de acordo com a invenção possuem o benefício particular de remover o sítio proteolítico entre Lys260 e Arg261.

[0010] De acordo com a invenção, as alterações de aminoácidos em uma ou mais posições correspondentes aos resíduos 258-266 podem ser deleções, substituições ou inserções. Além disso, as substituições de aminoácidos que substituem aminoácidos básicos por aminoácidos que não são básicos podem ser utilizadas para criar variantes de acordo com a invenção.

[0011] Em particular, as variantes de D3 da invenção podem incluir uma ou mais substituições de aminoácidos nas posições selecionadas do grupo que consiste em Lys258, Ser259, Lys260, Arg261, Lys263, Lys 264, Asp265 e Arg266. Tais alterações de aminoácidos podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação para induzir as alterações estruturais e/ou funcionais descritas anteriormente. Por exemplo, a variante D3 pode incorporar uma, duas, três, quatro ou mais das substituições a seguir: Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Ala, Lys260Asn, Lys260Gln, Lys260Gly, Arg261Ala, Arg261Asp, Arg261Thr, Lys263Gly, Lys263Ser e/ou Lys264Gly.

[0012] Em algumas modalidades, a substituição é uma posição Lys260. A substituição pode substituir Lys260 por um aminoácido que

não é básico, por exemplo, Ala, Asn, Gln ou Gly. Substituições adicionais em adição a Lys260 podem ocorrer em Ser259 e Arg261. Particularmente, algumas variantes de D3 da invenção incorporam as substituições Ser259Asp, Lys260Asn e Arg261Thr. Em uma modalidade adicional, as variantes de D3 da invenção incorporam as substituições Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr e Lys264Gly, enquanto opcionalmente deletam Lys263 e Asp265. Alternativamente, uma variante D3 da invenção incorpora as substituições Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr e Lys264Gly enquanto deleta Lys263, Lys264 e Asp265.

[0013] Em outras modalidades de acordo com a invenção, uma variante D3 que inclui uma substituição que substitui Lys260 inclui alternativamente substituições adicionais em um ou mais de Lys258, Ser259, Arg261, Lys263 e Lys264. Por exemplo, em uma modalidade, uma variante D3 inclui as substituições Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261 Asp e opcionalmente Lys263Ser e Lys264Gly.

[0014] Em modalidades adicionais, em adição às substituições em Ser259, Lys260 e Arg261, um ou mais dos resíduos que correspondem a Lys263, Lys264, Asp265 e Arg266 são deletados, enquanto que em uma outra modalidade, um ou mais de Lys263, Lys264, Asp265 e Arg266 são substituídos por um aminoácido que não é básico. Em uma modalidade adicional, a substituição em Lys264 é Lys264Gly e, opcionalmente, Lys263 e Asp265 são deletados. Outras variantes de D3 da invenção incorporam as substituições Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr e Lys264Gly e opcionalmente, a deleção de resíduos que correspondem a Lys263, Asp265 e Arg 266.

[0015] Será entendido pelos versados na técnica que as variantes de p40 e as partes ativas das mesmas que incorporam uma variante D3 como é descrito aqui estão dentro do âmbito da invenção. Similarmente, as proteínas IL-12 e as partes ativas das mesmas que

contêm uma variante de p40 (variantes de IL-12) também estão dentro do âmbito da invenção. A invenção abrange ainda proteínas de fusão que incluem as variantes de IL-12 da invenção e uma porção selecionada do grupo que consiste em uma porção de anticorpo, uma citocina sem ser IL-12 ou uma parte ativa da mesma.

[0016] Similarmente, as proteínas IL-23 e as partes ativas das mesmas que contêm uma variante de p40 (variantes de IL-23) também estão dentro do âmbito da invenção. A invenção abrange ainda proteínas de fusão que incluem as variantes de IL-23 da invenção e uma porção selecionada do grupo que consiste em uma porção de anticorpo, uma citocina sem ser IL-23 ou uma parte ativa da mesma.

[0017] Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um ácido nucléico que codifica qualquer uma das variantes de D3, variantes de p40, variantes de IL-12 e variantes de IL-23 da invenção. A invenção abrange ainda uma célula, por exemplo, uma célula procariótica, que inclui tal ácido nucléico.

[0018] A invenção apresenta ainda métodos de produção de tais variantes de D3, variantes de p40, variantes de IL-12, variantes de IL-23 e proteínas de fusão contendo estas porções.

[0019] Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de utilização das variantes da invenção e os ácidos nucléicos que codificam as mesmas. Por exemplo, a invenção abrange um método de tratamento de um paciente que inclui a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficiente de uma variante de p40 da invenção ou de uma parte ativa da mesma.

[0020] As características e as vantagens anteriores e outras da invenção assim como a própria invenção, serão mais completamente entendidas partindo das figuras, da descrição e das reivindicações a seguir.

[0021] Em resumo, a invenção refere-se a:

- Uma variante de um domínio D3 da p40 da IL-12, em que a variante possui pelo menos 85% de identidade de sequência com um domínio D3 da p40 da IL-12 humana do tipo selvagem e compreende uma alteração de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem aos resíduos nas posições 258-266 da p40 da IL-12 humana madura parental.

- Uma variante correspondente, em que a alteração elimina o sítio de protease entre Lys260 e Arg261.

- Uma variante correspondente, em que a alteração é uma substituição ou uma deleção.

- Uma variante correspondente, em que a alteração é uma substituição selecionada do grupo que consiste em Lys258, Lys260, Lys263 e Lys264.

- Uma variante correspondente, em que uma ou mais das substituições de aminoácidos a seguir são selecionadas:

Lys258Gln,

Lys260Ala, Lys260Asn, Lys260Gln, Lys260Gly,

Lys263Gly, Lys263Ser e

Lys264Gly.

- Uma variante correspondente, em que a substituição ocorre pelo menos na posição Lys260.

- Uma variante correspondente, em que a substituição coloca no lugar de um aminoácido básico um aminoácido que não é básico, selecionado do grupo que consiste em Ala, Asn, Gln ou Gly.

- Uma variante correspondente, em que a variante compreende ainda uma ou mais substituições nas posições Ser259, Arg261 ou Arg 266.

- Uma variante correspondente, em que as substituições são Ser259 e Arg261.

- Uma variante correspondente, em que as substituições

são Ser259Asp, Lys260Asn e Arg261Thr.

- Uma variante correspondente, que compreende ainda a substituição Lys264Gly.
- Uma variante correspondente, em que adicionalmente um ou ambos os resíduos Lys263 e Asp265 são deletados.
- Uma variante correspondente, em que um ou mais resíduos correspondentes a Lys263, Lys264, Asp 265 e Arg266 são deletados.
- Uma variante correspondente, que compreende ainda uma ou mais das substituições selecionadas do grupo que consiste em:

Lys263, Lys264, Asp 265 e Arg266, em que o resíduo de aminoácido original correspondente é substituído por um aminoácido que não é básico.

- Uma variante correspondente que compreende ainda uma ou mais substituições selecionadas do grupo que consiste em:

Lys258, Ser259, Arg261, Lys263 e Lys264.

- Uma variante correspondente, em que as substituições são Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln e Arg261Asp.

- Uma variante correspondente, que compreende ainda as substituições Lys263Ser e Lys264Gly.

- Uma variante correspondente, que compreende especificamente

(i) as substituições a seguir: Ser259Asp, Lys260Asn e Arg261Thr e

(ii) as deleções a seguir: Lys263, Lys264 e Asp265, em que as ditas posições estão relacionadas com a molécula do tipo selvagem não modificada, formando assim a linha de sequência Lys - Asp - Asn - Thr - Glu - Arg nas posições 258 - 263 da variante.

- Uma variante correspondente, que compreende

especificamente

(i) as substituições a seguir: Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr e

Lys264Gly e

(ii) as deleções a seguir: Lys263 e Asp265, em que as ditas posições estão relacionadas com a molécula do tipo selvagem não modificada, formando assim a linha de sequência: Lys - Asp - Asn - Thr - Glu - Gly - Arg nas posições 258 - 264 da variante.

- Uma variante correspondente, que compreende as substituições a seguir: Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp, formando assim a linha de sequência: Gln - Asp - Gln - Asp - Glu - Lys - Lys - Arg nas posições 258 - 265 da variante.

- Uma variante correspondente, que compreende as substituições a seguir: Lys258Gln, Ser259Asp, Lys260Gln, Arg261Asp, Lys263Ser, Lys264Gly, formando assim a linha de sequência: Gln - Asp - Gln - Asp - Glu - Ser - Gly - Arg nas posições 258 - 265 da variante.

- Uma proteína IL-12 ou um fragmento da mesma, contendo a variante que é descrita acima e abaixo.

- Uma proteína IL-23 ou um fragmento da mesma, contendo a variante que é descrita acima e abaixo.

- Uma proteína de fusão que compreende uma variante ou uma proteína IL-12 ou IL-23 como descrito e um anticorpo ou uma parte ativa do mesmo.

- Uma proteína de fusão correspondente, em que a dita variante ou a dita proteína é fundida ao terminal C do dito anticorpo ou parte do anticorpo, preferencialmente na parte Fc do dito anticorpo, em que o dito anticorpo se direciona a抗ígenos tumorais, tal como KS (EpCam) ou 14.18 ou receptores que são superexpressos no tecido tumoral, tal como HER2 ou EGFR ou VEGFR.

- Uma molécula de ácido nucléico ou de DNA que codifica uma variante ou uma proteína IL-12 ou IL-23 ou uma proteína de fusão como descrito acima ou abaixo.
- Um vetor de expressão que compreende o dito ácido nucléico.
- Uma célula hospedeira que produz uma variante ou uma proteína IL-12 ou IL-23 ou uma proteína de fusão como descrito.
- Uma composição farmacêutica adequada para o tratamento de doenças ativadas por IL-12 ou IL-23 que compreende em uma quantidade farmacologicamente ativa uma variante, uma proteína IL-12 ou IL-23 ou uma proteína de fusão que compreende tal variante ou proteína IL-12 ou IL-23, opcionalmente junto com um diluente ou um excipiente veículo farmaceuticamente aceitável com outros fármacos farmacologicamente eficientes em um regime de terapia de combinação.
- Um uso da dita composição farmacêutica ou de seus componentes eficientes para a produção de um medicamento para o tratamento de câncer ou de uma doença autoimune.

Breve Descrição das Figuras

[0022] A figura 1 representa a sequência de aminoácidos madura da cadeia α, isto é, da subunidade p35, de uma IL-12 humana madura (do tipo selvagem) (SEQ ID NO: 1).

[0023] A figura 2 representa a sequência de aminoácidos madura da cadeia β, isto é, da subunidade p40, de uma IL-12 humana madura (do tipo selvagem) (SEQ ID NO: 2). O domínio D3, correspondente às posições 211-306 (SEQ ID NO: 26), está em itálico e o fragmento peptídico correspondente às posições 258-266 está sublinhado (SEQ ID NO: 5), com Lys260 e Arg261 evidenciados em negrito.

[0024] A figura 3 representa a sequência de aminoácidos madura da cadeia α, isto é, da subunidade p19, de uma IL-23 humana madura

(do tipo selvagem) (SEQ ID NO: 3).

[0025] A figura 4A mostra o gel de SDS-PAGE para várias bateladas purificadas de IL-12 humana produzida na forma de proteínas de fusão com anticorpo (faixas 1 – 8), enquanto a figura 4B mostra o gel de SDS-PAGE para várias bateladas purificadas de IL-23 humana produzida na forma de proteínas de fusão com anticorpo (faixas 1 – 3). As subunidades IL-12p35 e IL-23p19 estão covalentemente ligadas à cadeia pesada do anticorpo. A banda de 6 kD é indicada por uma seta. Os pesos moleculares (kD) são indicados para os marcadores (faixa M).

[0026] A figura 5 representa a sequência de aminoácidos do fragmento peptídico C-terminal da subunidade IL-12p40 humana madura (do tipo selvagem). O fragmento começa na Arg261 (SEQ ID NO: 4).

[0027] A figura 6 representa a sequência de aminoácidos de um fragmento peptídico correspondente às posições 258-266 de uma subunidade IL-12p40 humana madura (do tipo selvagem) (SEQ ID NO: 5).

[0028] As figuras 7.1 e 7.2 representam um alinhamento de sequências de aminoácidos das subunidades IL-12p40 de vários mamíferos incluindo seres humanos, babuíno (*Papio anubis*), macaco rhesus (*Macaca mulatta*), mangabei (*Cercocebus torquatus*), cachorro (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), cavalo (*Equus caballus*), porco (*Sus scrofa*), vaca (*Bos Taurus*), cabra (*Capra hircus*), ovelha (*Ovis aries*), cervo (*Cervus elaphus*), búfalo d'água (*Bubalus bubalis*), hamster (*Mesocricetus auratus*), porquinho-da-Índia (*Cavia porcellus*), rato do algodão (*Sigmodon hispidus*), rato (*Rattus norvegicus*) e camundongo (*Mus musculus*). Os dois aminoácidos em negrito indicam o sítio de clivagem proteolítica.

[0029] A figura 8 representa a sequência de aminoácido de uma

variante, referida aqui como p40V1, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 6). A sequência engenheirada está sublinhada.

[0030] A figura 9 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V2, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 7). A sequência engenheirada está sublinhada.

[0031] A figura 10 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V3, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 8). A sequência engenheirada está sublinhada.

[0032] A figura 11 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V4, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 9). A sequência engenheirada está sublinhada.

[0033] A figura 12 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V5, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 10). A alteração está sublinhada.

[0034] A figura 13 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V6, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 11). As alterações estão sublinhadas.

[0035] A figura 14 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V7, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 12). A alteração está sublinhada.

[0036] A figura 15 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V8, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 13). A alteração está sublinhada.

[0037] A figura 16 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V9, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 14). A alteração está sublinhada.

[0038] A figura 17 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V10, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 15). A alteração está sublinhada.

[0039] A figura 18 representa a sequência de aminoácido de uma variante, referida aqui como p40V11, de uma subunidade IL-12p40 humana madura (SEQ ID NO: 16). As alterações estão sublinhadas.

[0040] A figura 19 representa a sequência de ácido nucléico que codifica a subunidade IL-12p40 humana de comprimento completo (do tipo selvagem) (SEQ ID NO: 21).

[0041] A figura 20 representa a sequência de ácido nucléico de um fragmento de nucleotídeos sintético, referida aqui como V1V2, que codifica partes de variantes de p40 p40V1 e p40V2. O fragmento V1V2 abrange um fragmento V1 incluindo uma região (sublinhada) que codifica a SEQ ID NO: 17. Este é seguido por uma sequência ligante (letra minúscula) e substancialmente, um fragmento V2 incluindo uma região (sublinhada) que codifica a SEQ ID NO: 18.

[0042] A figura 21 representa a sequência de ácido nucléico de um fragmento de nucleotídeos sintético, referida aqui como V3V4, que codifica partes de variantes de p40 p40V3 e p40V4. O fragmento V3V4 abrange um fragmento V3 incluindo uma região (sublinhada) que codifica a SEQ ID NO: 19. Este é seguido por uma sequência ligante (letra minúscula) e subsequentemente, um fragmento V4 incluindo uma região (sublinhada) que codifica a SEQ ID NO: 20.

[0043] A figura 22 representa a sequência de ácido nucléico de um fragmento de nucleotídeos sintético, referida aqui como V5V6, que codifica partes de variantes de p40 p40V5 e p40V6. O fragmento V5V6 abrange um fragmento V5 incluindo uma substituição de códon (sublinhada) que codifica Arg261Ala. Este é seguido por uma sequência ligante (letra minúscula) e subsequentemente, um fragmento V6 incluindo substituições de códons (sublinhadas) que

codificam Lys260Ala e Arg261Ala.

[0044] A figura 23 representa a sequência de ácido nucléico de um fragmento de nucleotídeos sintético, referida aqui como V7V8, que codifica partes de variantes de p40 p40V7 e p40V8. O fragmento V7V8 abrange um fragmento V7 incluindo uma substituição de códon (sublinhada) que codifica Lys260Ala. Este é seguido por uma sequência ligante (letra minúscula) e subsequentemente, um fragmento V8 incluindo uma substituição de códon (sublinhada) que codifica Lys260Gly.

[0045] A figura 24 é um Western blot com um anticorpo anti-hu-p40 policlonal. Os sobrenadantes de células transfectadas com IL-12p40 do tipo selvagem e Variantes de IL-12p40 (V1-V4) foram coletados e processados em um gel de SDS-PAGE. Dois clones independentes (a, b) de cada Variante de IL-12p40 p40V1, p40V2, p40V3 e p40V4 foram testados. A seta aponta para a banda de IL12p40 clivada que não possui o fragmento C-terminal (faixa p40 wt).

[0046] A figura 25 mostra o gel de SDS-PAGE para as proteínas de fusão anticorpo-IL12 contendo as variantes de p40 p40V1, p40V2, p40V3, p40V4, p40V5, p40V6, p40V7, p40V8 e p40 do tipo selvagem (faixas 1-9). A banda principal mais acima representa a proteína de fusão entre a cadeia pesada do anticorpo e a subunidade p35 e a banda principal inferior representa a cadeia pesada do anticorpo. A banda de 6 kDa não era detectada em qualquer uma das faixas das proteínas variantes, exceto na faixa 5. Os pesos moleculares (kD) são indicados para os marcadores (faixa M).

[0047] A figura 26 mostra os dados farmacocinéticos das proteínas de fusão anticorpo-IL12 contendo as variantes de p40 p40V1 - p40V8 comparadas com as proteínas de fusão anticorpo-(do tipo selvagem)-IL12, administradas de forma intravenosa.

[0048] A figura 27A mostra os dados farmacocinéticos das

proteínas de fusão anticorpo-IL12 contendo as variantes de p40 p40V1 - p40V4 comparadas com as proteínas de fusão anticorpo-(do tipo selvagem)-IL12 (painel A) e a figura 27B mostra os dados farmacocinéticos das proteínas de fusão anticorpo-IL12 contendo as variantes de p40 p40V5 - p40V8 comparadas com as proteínas de fusão anticorpo-(do tipo selvagem)-IL12 (painel B), administradas de forma subcutânea.

[0049] A figura 28 é uma variante de IL-12p40 que possui mutações fora da região D3 da proteína.

Descrição Detalhada da Invenção

[0050] A invenção descreve variantes da subunidade p40 da citocina interleucina-12 (IL-12) que possui maior estabilidade comparada com a proteína do tipo selvagem. Nestas variantes, uma região da subunidade p40 que normalmente não é estruturada e é sensível à clivagem proteolítica é mutada para ser mais resistente à clivagem proteolítica. Esta região, no domínio D3, fica próxima ao terminal C da subunidade p40, abrangendo um filamento de polipeptídeos que corresponde aos aminoácidos 258-266 na p40 humana madura (p40(258-266)).

[0051] A subunidade IL-12p40 é também uma subunidade de componente da citocina interleucina-23 (IL-23). A IL-23 possui duas subunidades, a subunidade α "p19" e a subunidade β "p40". A subunidade p40 da IL-23 é a mesma que a da IL-12p40. Portanto, as variantes da subunidade IL-12p40 são similarmente variantes da subunidade IL-23p40.

[0052] Em uma classe geral de modalidades, uma ou mais mutações são introduzidas na região de p40 correspondente aos resíduos de aminoácidos 258-266 para eliminar o sítio de clivagem, que na p40 humana corresponde ao sítio entre Lys260 e Arg261. Em modalidades adicionais, são introduzidas nesta região mutações

específicas que através de modelagem geram uma estrutura mais firmemente dobrada. Em um outro aspecto da invenção, é previsto que as mutações introduzidas adicionalmente evitam a obtenção da região engenheirada da subunidade p40 imunogênica. Por exemplo, as substituições de aminoácidos na região engenheirada da subunidade p40 são escolhidas para evitar a criação de peptídeos que podem ser reconhecidos como epítopos potenciais de células T em seres humanos.

[0053] As mutações podem ser introduzidas na região de p40 correspondente aos resíduos de aminoácidos 258-266 através de uma variedade de mecanismos. Por exemplo, em uma modalidade, uma mutação ou mutações são introduzidas através da substituição de um resíduo de aminoácido por um outro. Em uma modalidade adicional, uma mutação ou mutações são introduzidas através da deleção de um ou mais resíduos da subunidade p40. Ainda em uma outra modalidade, uma mutação ou mutações são introduzidas através da inserção de um ou mais resíduos de aminoácidos dentro da subunidade p40.

[0054] Em uma modalidade, as variantes de p40 da invenção ficam contidas em composições protéicas tais como proteínas IL-12, proteínas de fusão de IL-12, proteínas IL-23, proteínas de fusão de IL-23 ou homodímeros de p40. Por exemplo, em uma modalidade, uma proteína IL-12 contém uma subunidade p35 e uma variante de p40 de acordo com a invenção. Em uma outra modalidade, uma proteína IL-23 contém uma subunidade p19 e uma variante de p40 de acordo com a invenção. Em uma modalidade adicional, uma proteína de fusão contém uma parte de anticorpo fundida com IL-12 contendo uma variante de IL-12p40. Ainda em uma modalidade adicional, uma proteína de fusão contém uma parte de anticorpo fundida com IL-23 contendo uma variante de IL-12p40. Em uma modalidade adicional, a parte de anticorpo da proteína de fusão é

um anticorpo intacto, uma região Fc, um sc-Fv, uma porção de ligação ao antígeno de um anticorpo ou um fragmento ativo de um anticorpo. Ainda em uma outra modalidade, uma proteína de fusão de acordo com a invenção inclui uma variante de IL-12p40 fundida com uma citocina sem ser IL-12 ou sem ser IL-23 ou uma parte ativa da mesma.

[0055] Em um aspecto adicional da invenção, as composições de proteína que contêm uma das variantes de p40 da invenção possuem uma meia-vida circulante mais longa que as da proteína do tipo selvagem correspondente. Assim, em comparação com as proteínas IL-12 ou IL-23 que contêm a subunidade p40 do tipo selvagem, as variantes de IL-12 ou as variantes de IL-23 que incluem uma subunidade p40 engenheirada da invenção possuem propriedades melhoradas como agentes terapêuticos em relação a sua produção, formulação e farmacocinética.

[0056] Em uma modalidade adicional, as mutações na sequência de aminoácidos de IL-12p40 são introduzidas fora da região de IL-12p40(258-266) e opcionalmente fora do domínio IL-12p40 D3 de IL-12p40. Tais mutações podem ser introduzidas em outro lugar no domínio D3 de IL-12p40 e podem ser introduzidas em outros domínios. Por exemplo, a figura 28, representa uma sequência de uma subunidade p40 de IL-12 que possui alterações em uma sequência de aminoácidos fora dos resíduos 258-266. Leong e outros, (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 1163-1168, cujo conteúdo é incorporado aqui como referência, ensinam vários resíduos que podem ser mutados na sequência de aminoácidos de IL-12 p40 além da região 258-266. Ainda, devido ao fato de que a estrutura em cristal tridimensional de IL-12p40 é conhecida (Yoon e outros, (2000), EMBO J., 19: 3530-3541, cujo conteúdo é incorporado aqui como referência) e que os resíduos essenciais à interação da subunidade p40 com a subunidade p35 de IL-12 são conhecidos, a seleção de outras

mutações que não destruirão a funcionalidade da subunidade p40 pode ser determinada por um versado na técnica.

Determinação do produto de clivagem

[0057] A invenção se baseia em parte na observação de que a subunidade IL-12p40 é susceptível a um evento de clivagem proteolítica específica e nos novos resultados experimentais que definem o sítio de clivagem. Foi observado que uma proteína IL-12 recombinante purificada, produzida em células NS/0 como descrito no Exemplo 2, exibia coerentemente um grau de heterogeneidade quando a proteína recombinante era separada por eletroforese em um gel de SDS-PAGE sob condições redutoras, claramente visíveis na forma de uma banda de proteína adicional de peso molecular de aproximadamente 6 kD. Uma observação similar foi feita para a proteína IL-23 recombinante. Isto é ilustrado na figura 4 que mostra o gel de SDS-PAGE para várias bateladas purificadas de composições protéicas de IL-12 humana (Painel A) e de IL-23 humana (Painel B) produzidas na forma de proteínas de fusão com anticorpo.

[0058] O contaminante foi purificado e sua sequência de aminoácidos foi determinada, como descrito no Exemplo 3 e foi descoberto que corresponde à sequência do fragmento de 46 aminoácidos C-terminal da própria subunidade IL-12p40, gerado através da clivagem proteolítica entre Lys260 e Arg261 (figura 5-SEQ ID NO: 4). A clivagem entre Lys260 e Arg261 parece ser altamente favorecida apesar de uma prevalência de aminoácidos básicos na região que circunda o sítio de clivagem (...KSKREKKDR... (figura 6-SEQ ID NO: 5) em que Lys260 e Arg261 estão indicados em negrito). Entretanto, apesar ser clivado partindo da subunidade p40, o fragmento peptídico C-terminal permanece não covalentemente associado com o resto da subunidade p40, tornando difícil remover a heterogeneidade resultante através da purificação adicional da

proteína recombinante.

Proteína L-12p40

[0059] A subunidade p40 humana madura é uma proteína de 306 aminoácidos que se assemelha a um receptor α de citocina de classe I solúvel, composto dos domínios D1, D2 e D3. O sítio de clivagem (entre Lys260 e Arg261) fica dentro de D3, um domínio de fibronectina do tipo III de 96 aminoácidos abrangendo a região de I211 até S306. A sequência para a subunidade IL-12p40 humana madura é mostrada na figura 2. A sequência de aminoácidos para D3 é mostrada na figura 2 em itálico. Na estrutura cristalográfica por raio X publicada do heterodímero de IL-12 humana (Yoon e outros (2000), EMBO J., 19: 3530-41) uma parte de uma alça dentro da região de p40 humana (258 – 266) do domínio D3 não é resolvida. Sem desejar ficar ligado à teoria, as regiões não resolvidas nas estruturas em cristal constituem frequentemente uma indicação de alças não estruturadas flexíveis e podem constituir sítios-alvo para a proteólise.

[0060] Um alinhamento estrutural primário da subunidade p40 madura de uma variedade de espécies de mamíferos é mostrado nas figuras 7.1 e 7.2, incluindo ser humano; os primatas babuíno, macaco rhesus e mangabei; cachorro; gato, cavalo; porco; os ruminantes vaca, cabra, ovelha, cervo, búfalo d'água; e os roedores hamster, porquinho-da-índia, rato do algodão, rato e camundongo. No alinhamento a região próxima a p40(258 – 266) exibe variabilidade de sequência, particularmente em relação ao seu comprimento. Particularmente, em algumas espécies, notavelmente ruminantes, a sequência é mais curta e em outras, tais como em roedores, a sequência, em alguns casos, podem conter um inserto adicional. Em muitas espécies, o motivo dipeptídico correspondente à p40 K260R261 humana é conservado, identicamente ou exibindo dois aminoácidos básicos. Estas espécies incluem espécies importantes na agricultura e comercialmente

incluindo, mas não limitadas ao cavalo, à vaca, à cabra, ao porco e à ovelha. Consequentemente, a introdução de uma ou mais mutações na região da IL-12p40 sem ser humana correspondentes aos resíduos 258-266 da IL-12p40 humana que são análogas às mutações ensinadas aqui em relação à IL-12p40 humana pode provar ser útil na redução ou na eliminação da clivagem proteolítica da IL-12p40 não humana no sítio de clivagem K260R261.

[0061] Em princípio, de acordo com a invenção, é possível utilizar uma variante de IL-12p40 de uma espécie que não possui um motivo dipeptídico carregado positivamente correspondente a K260R261 da IL-12p40 humana em um ser humano ou em outro organismo heterólogo. Entretanto, na prática da invenção, é importante observar que as formas não humanas de IL-12p40 levarão geralmente a anticorpos anti-p40 quando administradas a seres humanos. De forma mais ampla, não é ótimo administrar p40 de uma espécie a uma outra. Em adição, o potencial de várias subunidades p40 não humanas de serem proteoliticamente clivadas é geralmente desconhecido. Em adição, as subunidades p40 de uma espécie pode não funcionar em uma outra espécie, na etapa de montagem com subunidades tal como p35 ou p19 ou na etapa de interação com as subunidades receptoras.

Proteínas IL-12p40 variantes

[0062] A invenção fornece proteínas IL-12p40 variantes com mutações no domínio D3 que aumentam a estabilidade. Como utilizado aqui, o termo "variante D3" refere-se a um domínio D3 de uma subunidade p40 humana, por exemplo, de IL-12 ou de IL-23, que possui uma ou mais alterações de aminoácidos quando comparado com D3 do tipo selvagem. O termo "variante de p40" é utilizado aqui para se referir a uma subunidade p40 humana, por exemplo, de IL-12 ou de IL-23, com mutações no domínio D3, isto é, uma subunidade p40 contendo uma variante D3. O termo "variante de IL-12" é utilizado

aqui para se referir a uma proteína IL-12 humana contendo uma variante de p40, O termo "variante de IL-23" é utilizado aqui para se referir a uma proteína IL-23 humana contendo uma variante de p40,

[0063] De acordo com uma modalidade da invenção, o domínio D3 de uma variante de p40 possui pelo menos 70% ou mais de identidade de sequência com o domínio D3 da IL-12p40 do tipo selvagem. Em uma modalidade adicional, o domínio D3 de uma variante de p40 possui pelo menos 75% ou mais de identidade de sequência com o domínio D3 da IL-12p40 do tipo selvagem. Ainda em uma outra modalidade, o domínio D3 de uma variante de p40 possui pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com o domínio D3 da IL-12p40 do tipo selvagem, enquanto que em modalidades adicionais, o domínio D3 de uma variante de p40 possui pelo menos 81% ou mais ou pelo menos 82% ou mais ou pelo menos 83% ou mais ou pelo menos 84% ou mais ou pelo menos 85% ou mais ou pelo menos 86% ou mais ou pelo menos 87% ou mais ou pelo menos 88% ou mais ou pelo menos 89% ou mais ou pelo menos 90% ou mais ou pelo menos 91% ou mais ou pelo menos 92% ou mais ou pelo menos 93% ou mais ou pelo menos 94% ou mais ou pelo menos 95% ou mais ou pelo menos 96% ou mais ou pelo menos 97% ou mais ou pelo menos 98% ou mais ou pelo menos 99% ou mais de identidade com o domínio D3 da IL- 12p40 do tipo selvagem.

[0064] De acordo com uma outra modalidade da invenção, a sequência de aminoácidos de uma variante de p40 possui pelo menos 70% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da p40 de IL-12 do tipo selvagem madura. Em uma modalidade adicional, a sequência de aminoácidos de uma variante de p40 possui pelo menos 75% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da IL-12p40 do tipo selvagem madura. Ainda em uma outra modalidade, a sequência de aminoácidos de uma variante de p40 possui pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com

a sequência de aminoácidos da IL-12p40 do tipo selvagem madura, enquanto em modalidades adicionais, a sequência de aminoácidos de uma variante de p40 possui pelo menos 81% ou mais ou pelo menos 82% ou mais ou pelo menos 83% ou mais ou pelo menos 84% ou mais ou pelo menos 85% ou mais ou pelo menos 86% ou mais ou pelo menos 87% ou mais ou pelo menos 88% ou mais ou pelo menos 89% ou mais ou pelo menos 90% ou mais ou pelo menos 91% ou mais ou pelo menos 92% ou mais ou pelo menos 93% ou mais ou pelo menos 94% ou mais ou pelo menos 95% ou mais ou pelo menos 96% ou mais ou pelo menos 97% ou mais ou pelo menos 98% ou mais ou pelo menos 99% ou mais de identidade com a sequência de aminoácidos de IL-12p40 do tipo selvagem madura.

[0065] Para determinar a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos, as sequências são alinhadas com a finalidade de comparação ótima (por exemplo, podem ser introduzidos espaços na sequência de uma primeira sequência de aminoácidos para o alinhamento ótimo com uma segunda sequência de aminoácidos). A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade = (nº de posições idênticas/nº total de posições) vezes 100). Se as sequências que estão sendo comparadas tiverem tamanho desigual, a mais curta das sequências é utilizada para determinar o número total de posições. A determinação da porcentagem de identidade entre duas sequências também pode ser realizada utilizando um algoritmo matemático.

[0066] Um exemplo não limitante de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2264-68, modificado como em Karlin e Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 5873-77. Tal algoritmo é incorporado nos programas

NBLAST e XBLAST de Altschul e outros, (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-10, As buscas de nucleotídeos por BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, escore = 100, comprimento de palavra = 12. As buscas de proteínas por BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, escore = 50, comprimento de palavra = 3. Para a obtenção de alinhamentos com espaços com a finalidade de comparação, o Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul e outros, (1997) *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402. Quando são utilizados os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros pré-estabelecidos dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser utilizados.

[0067] Em uma modalidade, a invenção fornece variantes de D3 contendo uma alteração que remove o sítio de clivagem proteolítica entre Lys260 e Arg261. Em uma modalidade, o aminoácido na posição Lys260 é mutado. Em uma modalidade mais específica, a Lys260 é substituída por um aminoácido que não é básico. Os aminoácidos que não são básicos incluem, por exemplo, Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr ou Val. Por exemplo, a Lys 260 é substituída por Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr ou Val. Em uma modalidade alternativa, a Lys260 é substituída por selenocisteína. Os exemplos de variantes de D3 em que a Lys260 foi substituída por um outro aminoácido são mostrados nas figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 18.

[0068] Em uma outra modalidade, a Arg261 é mutada. Por exemplo, em uma modalidade, a Arg 261 é substituída por qualquer aminoácido que não é básico. Por exemplo, em uma modalidade, a Arg261 é substituída por Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr ou Val. Em uma modalidade alternativa, a Arg261 é substituída por selenocisteína. Os exemplos de variantes de D3 em que a Arg261 foi substituída por um outro

aminoácido são mostrados nas figuras 12, 13, 17 e 18. Em uma modalidade adicional, a Lys260 e a Arg261 são mutadas. Por exemplo, em uma modalidade, a Lys260 e a Arg261 são cada uma substituídas por um outro aminoácido. Por exemplo, a Lys260 é substituída por Gln, Ala, Asn ou Gly e a Arg261 é substituída por Ala, Asp ou Thr. Os exemplos de variantes de D3 em que tanto a Lys260 quanto a Arg261 foram substituídas por outros aminoácidos são mostrados nas figuras 13 e 18.

[0069] Em adição, a Lys260 e a Arg261 são deletadas em uma modalidade, enquanto que em uma modalidade adicional, um aminoácido é inserido entre Lys260 e Arg261.

[0070] Em uma modalidade adicional, uma variante de D3 é criada em que uma ou mais de Lys258, Ser259, Lys260, Arg261, Lys263, Lys264 ou Arg266 é cada uma substituída por um outro aminoácido. Em uma modalidade, uma ou mais de Lys258, Ser259, Lys260, Arg261, Lys263, Lys264 ou Arg266 é cada uma substituída por um aminoácido que não é básico. Por exemplo, em uma modalidade, a Lys258 é substituída por Gln. Em uma outra modalidade, a Ser259 é substituída por Asp. Em uma outra modalidade, a Lys260 é substituída por Ala, Gly, Asn ou Gln. Em uma modalidade adicional, a Arg261 é substituída por Ala, Thr ou Asp. Ainda em uma outra modalidade, a Lys263 é substituída por Ser. Em uma modalidade adicional, a Lys264 é substituída por Gly. Em uma modalidade, a Arg266 é substituída por Gln, Asp, Asn ou Thr. Em uma modalidade adicional, a Lys263 e a Lys264 são cada uma substituídas por um outro aminoácido. Por exemplo, em uma modalidade a Lys263 e a Lys264 são cada uma substituídas por Ser e Gly, respectivamente. Ainda em uma outra modalidade, a Lys258, a Ser259, a Lys260, a Arg261, a Lys263 e a Lys264 são substituídas por Gln, Asp, Gln, Asp, Ser e Gly, respectivamente.

[0071] Em uma modalidade adicional, é criada uma variante de D3 em que uma ou mais de Ser259, Lys260 e Arg261 são cada uma substituídas por um outro aminoácido. Em uma modalidade adicional, uma ou mais de Ser259, Lys260 e Arg261 são cada uma substituídas por um aminoácido que não é básico. Por exemplo, em uma modalidade, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente.

[0072] Em uma outra modalidade, a Lys258, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são cada uma substituídas por um outro aminoácido. Por exemplo, em uma modalidade, a Lys258, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são cada uma substituídas por um aminoácido que não é básico. Em uma modalidade, a Lys258, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são cada uma substituídas por Gln, Asp, Gln e Asp, respectivamente. Em uma modalidade adicional, a Ser259, a Lys260, a Arg261 e a Lys264 são substituídas por Asp, Asn, Thr e Gly, respectivamente. Ainda em uma modalidade adicional, a Ser259, a Lys260, a Arg261 e a Lys264 são substituídas por Asp, Asn, Thr e Gly, respectivamente, enquanto a Lys263 e o Asp265 são deletados. Ainda em uma outra modalidade, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são cada uma substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente, enquanto a Lys263, a Lys264 e o Asp265 são deletados.

[0073] Sem desejar ficar ligado à teoria, acredita-se que as deleções possuam o efeito de reduzir a flexibilidade conformacional da região p40(258-266), reduzindo assim a capacidade do motivo Lys260-Arg261 de adotar uma conformação que permite a clivagem pela protease relevante. Portanto, em uma modalidade, um ou mais de Lys258, Ser259, Lys260, Arg261, Lys263, Lys264, Asp265 ou Arg266 é deletado.

[0074] Em uma modalidade adicional, é criada uma variante de D3 em que um ou mais de Lys263, Lys264, Asp265 ou Arg266 é deletado.

Por exemplo, em uma modalidade, a Lys263 e o Asp265 são deletados, enquanto que em uma outra modalidade, a Lys263, a Lys264 e o Asp265 são deletados. Em uma outra modalidade, a Lys263, a Lys264 e o Asp265 são deletados e substituídos por um ou mais aminoácidos que não são básicos. Em uma modalidade adicional, a Lys263, a Lys264, o Asp265 e a Arg266 são deletados. Em uma modalidade adicional, um ou mais de Lys263, Lys264, Asp265 ou Arg266 é deletado, enquanto um ou mais de Ser259, Lys260 ou Arg261 é substituído por um outro aminoácido. Por exemplo, em uma modalidade, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente, enquanto que a Lys263, a Lys264 e o Asp265 são deletados. Em uma modalidade adicional, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 são substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente, enquanto que a Lys263, a Lys264, o Asp265 e a Arg266 são deletados.

[0075] Em outras modalidades, as substituições de aminoácidos são selecionadas de forma que evitem a criação de novos epítopenos de células T. Os métodos para analisar as sequências peptídicas em relação ao seu potencial de criar epítopenos de células T são bem-conhecidos na técnica (ver, por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0153043; a Publicação Internacional Nº WO 00/034317; e Sturniolo e outros (1999), *Nature Biotech.*, 17: 555-61). Em uma modalidade, a sequência da IL-12p40(258-266) humana é substituída pela sequência KDNTER (SEQ ID NO: 17). Em outras palavras, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 foram substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente, enquanto a Lys263, a Lys264 e o Asp265 foram deletados de forma que a sequência resultante dos resíduos 258-263 na variante é KDNTER. A variante de IL-12p40 resultante é mostrada na figura 8.

[0076] Em uma outra modalidade, a sequência da IL-12p40(258-

266) humana é substituída pela sequência KDNTEGR (SEQ ID NO: 18). Em outras palavras, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 foram substituídas por Asp, Asn e Thr, respectivamente, enquanto que a Lys263, a Lys264 e o Asp265 foram deletados e substituídos apenas por um resíduo de Gly de forma que a sequência resultante dos resíduos 258-264 na variante é KDNTEGR. A variante de IL-12p40 resultante é mostrada na figura 9.

[0077] Ainda em uma outra modalidade, a sequência da IL-12p40(258-266) humana é substituída pela sequência QDQDEKKDR (SEQ ID NO: 19). Em outras palavras, a Lys258, a Ser259, a Lys260 e a Arg261 foram substituídas por Gln, Asp, Gln e Asp, respectivamente, de forma que a sequência resultante dos resíduos 258-266 na variante é QDQDEKKDR. A variante de IL-12p40 resultante é mostrada na figura 10,

[0078] Em uma modalidade adicional, a sequência da IL-12p40(258-266) humana é substituída pela sequência QDQDESGDR (SEQ ID NO: 20). Em outras palavras, a Lys258, a Ser259, a Lys260, a Arg261, a Lys263 e a Lys264 foram substituídas por Gln, Asp, Gln, Asp, Ser e Gly, respectivamente, de forma que a sequência resultante dos resíduos 258-266 é QDQDESGDR. A variação resultante da IL-12p40 é mostrada na figura 11.

[0079] Em uma modalidade adicional, uma variante de D3 está contida dentro de uma subunidade IL-12p40 ou de uma parte ativa da mesma. Por parte ativa, entende-se que uma subunidade IL-12p40 contendo uma variante de D3 possui pelo menos 10% de atividade em uma modalidade, pelo menos 20% em uma outra modalidade, pelo menos 30% em uma outra modalidade, pelo menos 50% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 70% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 75% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 80% de atividade em uma outra modalidade,

pelo menos 90% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 95% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 99% de atividade em uma modalidade adicional, pelo menos 100% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 150% de atividade em uma modalidade adicional, pelo menos 200% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 300% de atividade em uma modalidade adicional, pelo menos 400% de atividade em uma outra modalidade, pelo menos 500% de atividade em uma outra modalidade ou pelo menos 1000% de atividade em uma outra modalidade, em comparação com a atividade biológica de uma porção IL-12p40 do tipo selvagem.

Proteínas contendo variantes de IL-12p40

[0080] As variantes de IL-12p40 podem ser introduzidas dentro de composições protéicas no lugar da IL-12p40 do tipo selvagem. Os exemplos de composições protéicas biologicamente ativas que incluem IL-12p40 são homodímeros de p40, IL-12 e proteínas de fusão de IL-12 e IL-23 e proteínas de fusão de IL-23. Em um aspecto da invenção, o heterodímero IL-12 p35/variante de p40 consiste em cadeias polipeptídicas separadas. Alternativamente, o heterodímero IL-12 p35/variante de p40 consiste em uma única cadeia polipeptídica. Em um outro aspecto da invenção, o heterodímero IL-23 p19/variante de p40 consiste em cadeias polipeptídicas separadas. Alternativamente, o heterodímero IL-23 p19/variante de p40 consiste em uma única cadeia polipeptídica.

[0081] Em um outro aspecto da invenção, como parte de uma proteína de fusão de IL-12, o parceiro de fusão de IL-12 pode ser uma porção de anticorpo ou parte de uma porção de anticorpo. As porções de anticorpo úteis incluem aqueles que se direcionam a proteína de fusão de IL-12 para o ambiente de tumor, por exemplo, para as próprias células tumorais ou para o cerne necrótico de um tumor ou

para o estroma de suporte. Em uma outra modalidade da invenção, o parceiro de fusão é uma outra citocina. As citocinas úteis incluem, mas não estão limitadas a IL-2, IL-7 e IL-15.

[0082] Em um outro aspecto da invenção, como parte de uma proteína de fusão de IL-23, o parceiro de fusão de IL-23 pode ser uma porção de anticorpo ou parte de uma porção de anticorpo. As porções de anticorpo úteis incluem aqueles que direcionam a proteína de fusão de IL-23 para o ambiente de tumor, por exemplo, para as próprias células tumorais ou para o cerne necrótico de um tumor ou para o estroma de suporte. Em uma outra modalidade da invenção, o parceiro de fusão é uma outra citocina. As citocinas úteis incluem, mas não estão limitadas a IL-2, IL-7 e IL-15.

Ácidos nucléicos que codificam variantes de p40

[0083] Em um aspecto adicional da invenção, são considerados os ácidos nucléicos que codificam os polipeptídeos que contêm as variantes de p40 da invenção. Podem ser construídos os ácidos nucléicos que codificam as variantes de p40 da invenção, por exemplo, utilizando técnicas de DNA familiares aos versados na técnica. Os exemplos de procedimentos podem ser encontrados no Exemplo 1.

[0084] A figura 19 representa a sequência de ácido nucléico que codifica a subunidade IL-12p40 humana madura. As figuras 20-22 representam fragmentos de nucleotídeos sintéticos para codificar os exemplos de mutações encontrados nas variantes de p40 da invenção.

Métodos de Tratamento Utilizando Variantes de p40

[0085] As variantes de p40, incluindo as proteínas de fusão e as proteínas IL-12 ou as proteínas IL-23 contendo uma variante de p40, da invenção são úteis como agentes imunoterapêuticos, tais como para o tratamento de uma ampla variedade de cânceres, com base na atividade antitumor demonstrada das proteínas IL-12. Por exemplo, as

variantes de p40 da invenção podem ser utilizadas, preferencialmente como um heterodímero com p35, no tratamento de cânceres incluindo, mas não limitados a câncer renal, câncer de cólon, câncer ovariano, melanoma e linfoma de células T e como um adjuvante para vacinas para câncer. As variantes de p40 também podem ser utilizadas como parte de um homodímero p40/p40 para reduzir uma resposta de TH 1 (por exemplo, uma resposta de TH 1 associada com uma doença autoimune).

Administração

[0086] Todas as variantes de IL-12, as variantes de IL-23 e as variantes de p40 da invenção podem ser incorporadas em uma composição farmacêutica adequada para administração. Tais composições compreendem tipicamente uma variante de IL-12 ou uma proteína de fusão contendo uma variante de IL-12 e um veículo farmaceuticamente aceitável. Como utilizado aqui, é pretendido que o termo "veículo farmaceuticamente aceitável" inclua qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo da absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é bem-conhecido na técnica.

[0087] Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com sua rota pretendida de administração. Os exemplos de rotas de administração incluem a administração parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (tópica), transmucosa e retal. As soluções ou as suspensões utilizadas para a aplicação parenteral, intradérmica ou subcutânea podem incluir os componentes a seguir: um diluente esterilizado tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes

sintéticos; agentes antibacterianos tal como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tal como o ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tal como o ácido etilenodiaminatetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser preenchida em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou de plástico.

[0088] Os medicamentos que contêm as variantes de IL-12, as variantes de IL-23 ou as variantes de p40 da invenção podem ter uma concentração de 0,01 ou menor que 100% (p/p), embora a quantidade varie de acordo com a forma de dosagem dos medicamentos.

[0089] A dose de administração depende do peso corporal dos pacientes, da gravidade da doença, do tipo particular de variante de IL-12p40 que será utilizado e da opinião do médico. Por exemplo, para uma variante de IL-12 da invenção, é geralmente aconselhável administrar entre aproximadamente 0,01 até aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal ao dia, aproximadamente 0,02 até aproximadamente 2 mg/kg/dia no caso de injeção ou aproximadamente 0,5 mg/kg/dia. A dose pode ser administrada uma vez ou várias vezes ao dia de acordo com a gravidade da doença e da opinião do médico. Para uma proteína de fusão anticorpo-IL-12 ou uma proteína de fusão anticorpo-IL23 contendo uma variante de IL-12p40 da invenção, é geralmente aconselhável administrar entre aproximadamente 0,001 até aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dia, aproximadamente 0,002 até aproximadamente 0,5 mg/kg/dia no caso de injeção ou aproximadamente 0,1 mg/kg/dia. A dose pode ser administrada uma vez ou duas vezes durante um período de 2, 3 ou 4 semanas, de acordo com a natureza e a

gravidade da doença e com a opinião do médico.

[0090] Os aspectos da invenção são adicionalmente ilustrados pelos exemplos a seguir.

Exemplos

Exemplo 1: Clonagem das variantes das subunidades de IL-12p40 humana

[0091] Os ácidos nucléicos que codificam as variantes de p40 da invenção, em particular, p40V1 até p40V8 (SEQ ID NOS: 6-13), foram construídos utilizando técnicas de DNA padronizadas familiares aos versados na técnica. Em essência, um cassete de DNA, que codifica um fragmento que compreende a região que abrange os resíduos de aminoácidos mutados e que fica entre sítios de restrição convenientes, foi sintetizado *de novo* (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA) e substituído pelo fragmento correspondente da sequência do tipo selvagem contida em um plasmídeo de expressão carregando a sequência de p40 (ver, por exemplo, pNC-p40 na Patente U.S. Nº 6.838.260). A sequência de ácido nucléico que codifica a subunidade de IL-12p40 humana madura (do tipo selvagem) é mostrada na figura 19. Os plasmídeos de expressão que codificam as variantes de p40 foram obtidos dessa maneira.

[0092] Em particular, os ácidos nucléicos que codificam p40V1 e p40V2 foram gerados como a seguir. Um vetor de clonagem carregando os cassetes de DNA de p40V1 e p40V2 (pBHV1V2), sintetizado na forma de um fragmento contíguo como mostrado na figura 20, foi digerido com Bpu10 I e Eco RI/Sca I ou Bbs I, gerando um cassete EcoR I/Bpu10 I (para V1) e Bbs I/Bpu10 I (para V2) com extremidades compatíveis EcoR I/Bpu10 I, respectivamente. A digestão com Scal foi incluída para eliminar o fragmento de V2 com tamanho similar. Estes fragmentos purificados foram clonados em um vetor de expressão pNC-p40 em uma ligação tripla com os fragmentos

apropriados de Bpu10 I/Pvu I e Pvu I/Eco RI obtidos partindo de NC-p40.

[0093] Uma abordagem idêntica foi utilizada para gerar ácidos nucléicos que codificam p40V5 e p40V6, partindo da sequência sintetizada mostrada na figura 21 e para gerar ácidos nucléicos que codificam p40V7 e p40V8, partindo da sequência sintetizada mostrada na figura 23.

[0094] Similarmente, para gerar ácidos nucléicos que codificam p40V3 e p40V4, o plasmídeo (pBHV3V4) carregando a sequência sintetizada mostrada na figura 22, foi digerido com EcoR I/Bbs I/Sca I (a digestão com Sca I foi incluída para eliminar o fragmento V4 com tamanho similar) ou com Bbs I isoladamente, gerando um cassete EcoR I/Bbs I (para V3) e Bbs I (para V4), respectivamente, cada um com extremidades compatíveis com o plasmídeo de expressão pNC-p40 digerido com EcoR I/Bbs I. Observar que para a enzima de restrição Bbs I as sequências de reconhecimento e de clivagem são separadas e assim as sequências contendo vários sítios de reconhecimento de Bbs I podem gerar pontas penduradas diferentes específicas à sequência. Os cassetes V3 e V4 foram então purificados do gel e ligados, respectivamente, no plasmídeo de expressão pNC-p40 em uma ligação tripla utilizando os fragmentos Bbs I/Pvu I e Pvu I/Eco RI appropriados obtidos partindo de pNC-p40.

[0095] A mesma abordagem geral pode ser utilizada para gerar moléculas de ácidos nucléicos adicionais que codificam outras variantes de p40 consideradas pela invenção.

Exemplo 2: Expressão de variantes de p40 e de anticorpo-IL12; proteínas de fusão contendo variantes de p40

[0096] Foram utilizados métodos padronizados para gerar linhagens de células expressando as variantes de p40 da invenção (ver a Patente U.S. Nº 6.838.260). Os plasmídeos de expressão pNC-p40 que codificam

as variantes de p40 foram eletroporados nas células, por exemplo, células NS/0. As células foram plaqueadas e as células transfectadas foram selecionadas em um meio contendo G418. Os sobrenadantes de cultura dos clones resistentes ao fármaco foram analisados em relação à produção de p40 por ELISA e os maiores produtores foram subclonados e testados em relação à expressão estável.

[0097] Para gerar linhagens de células que expressam a proteína de fusão anticorpo-IL-12 com as variantes de p40 da invenção, foi seguida a abordagem de transfecção descrita na Patente U.S. Nº 6.838.360. Por exemplo, a proteína de fusão DI-NHS-IL12p40V1 foi obtida através da transfecção adicional da linhagem de células expressando p40V1 com um segundo plasmídeo, pdHL10lambdaDI-NHS-p35, que codifica o anticorpo NHS76, em que o C-terminal da região constante da cadeia pesada fica conectado com o N-terminal da subunidade p35 de IL-12. O plasmídeo de expressão pdHL10lambda é um derivado de pdHL7, em que o domínio constante da cadeia leve codificada é uma cadeia lâmbda. As células foram selecionadas em um meio contendo metotrexato e os transfectantes estáveis expressando as proteínas de fusão com anticorpo foram clonados através de métodos padronizados.

Exemplo 3: Purificação e caracterização de variantes de p40

[0098] Para caracterizar a integridade das variantes de p40 p40V1, p40V2, p40V3 e p40V4 (SEQ ID NOs: 6-9), os meios de cultura de células gastos de células NS-0 transfectadas de forma transitória em duplicata expressando estas variantes foram coletados para um Western blot com um anticorpo anti-hu-p40 policlonal, mostrado na figura 24. A subunidade p40 do tipo selvagem controle foi incluída como um controle (faixa 1). Foi observado que a espécies clivada não possuindo o fragmento de 6 kDa C-terminal, que é normalmente bem-resolvido partindo das espécies de p40 intactas pelas condições eletroforéticas (ver a seta que aponta para a banda na faixa 1), não

estava presente em qualquer uma das variantes testadas (faixas 2-9) e apenas a p40 intacta podia ser detectada. Assim, as variantes de p40 testadas eram resistentes a uma atividade proteolítica presente durante a expressão de proteína.

[0099] As proteínas de fusão com anticorpo contendo as variantes de IL-12p40 foram purificadas partindo do sobrenadante da cultura de células utilizando técnicas padronizadas baseadas na captura da Proteína A (ver a Patente U.S. Nº 6.838.260).

[00100] O gel de SDS-PAGE das proteínas de fusão com anticorpo purificadas de clones estáveis de NS-0 das variantes de p40 fornecidas nas SEQ ID NOS: 6-13 (faixas 1 – 8) e do controle não mutado (faixa 9) é mostrado na figura 25. A banda central das três bandas principais representa a subunidade p40 não clivada, com a banda desbotada ligeiramente acima indicando espécies mais glicosiladas. A banda principal mais acima representa a proteína de fusão entre a cadeia pesada do anticorpo e a subunidade p35 e a banda principal inferior representa a cadeia leve do anticorpo. Foi observado que, com a exceção da amostra da proteína de fusão com anticorpo contendo IL-12p40V5, a banda de 6 kDa não estava presente. Para IL-12p40V5, foi observada uma banda residual de 6 kDa (faixa 5).

Exemplo 4: Caracterização de um sítio de clivagem proteolítica na unidade IL-12p40 do tipo selvagem

[00101] A identidade do fragmento de proteína de aproximadamente 6 kDa contaminante foi determinada através de métodos padronizados. Sucintamente, a proteína DI-NHS-IL12 purificada foi desnaturada e reduzida em uma solução de guanidina a 6 M/ DTT a 1 mM tamponada a 55°C e submetida à separação por HPLC em fase inversa ao longo de uma coluna Vydac C4 com um gradiente de acetonitrila de 10% até 90%. A fração correspondente à espécie de peptídeo não identificada foi

coletada, seca e ressuspensa para a corrida em um gel de SDS-PAGE confirmando que correspondia ao fragmento de 6 kDa e para determinar a sequência do peptídeo através do sequenciamento N-terminal. A análise de sequenciamento revelou um peptídeo com a sequência REKKDRVFTD, que corresponde a uma sequência na subunidade IL-12p40 humana madura (do tipo selvagem) começando na Arg261.

Exemplo 5: Atividade biológica de proteínas IL-12 contendo variantes de p40

[00102] A atividade biológica de proteínas IL-12 contendo variantes de p40 foi medida através da indução de IFNy partindo de PBMCs humanas. As proteínas de fusão com anticorpo Ab-IL-12 contendo as variantes p40V1 até p40V8 foram comparadas com Ab-IL-12 com p40 do tipo selvagem e uma proteína IL-12 humana recombinante.

[00103] O ensaio de indução de IFNy foi realizado essencialmente como descrito em Gately e outros (1995), Current Protocols in Immunology, Seção 6.16.4 e Kobayashi e outros (1989), J. Exp Med., 170: 827-845. As PBMCs foram cultivadas com PHA-P durante 3 dias e então 25 IU/mL de hu IL-2 (R&D Systems, Minneapolis MN) foram adicionadas durante 24 horas adicionais. As células foram lavadas, 20 IU/mL de IL-2 foram adicionadas em todas as células, seguidas pela adição de proteínas de fusão IL-12, com uma série de diluição de duas vezes começando em 20 ng/mL (em termos de contribuição de massa relativa de IL-12 para a molécula). Vinte e quatro horas depois, a concentração de IFNy foi medida por ELISA utilizando pares de anticorpos obtidos na R&D Systems.

[00104] Os resultados destes dois experimentos separados utilizando PBMCs de doadores diferentes estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Atividade biológica de variantes de Ab-IL12 em um ensaio de indução de IFN γ .

Proteína	Indução de IFNy	
	ED50 (ng/mL)	Média (n=3)
		Desvio Padrão
Exp IR&D IL-12	0,04	0,02
Ab-IL12	0,43	0,21
Ab-IL12 V1	1,11	0,59
Ab-IL12 V2	1,09	0,32
Ab-IL12 V3	1,09	0,21
Ab-IL12 V4	1,44	0,48
Exp II		
R\$D IL-12	0,05	0,03
Ab-IL12	0,53	0,42
Ab-IL12 V1	1,53	0,58
Ab-IL12 V4	1,79*	0,80
Ab-IL12 V5	0,58	0,39
Ab-IL 12 V6	1,63	1,46
Ab-IL 12 V7	0,99	1,27
Ab-IL 12 V8	0,74	0,68

*(n=2)

[00105] Comparada com hu IL-12 recombinante, a atividade de Ab-IL12 com p40 do tipo selvagem era aproximadamente 10 vezes menor. Foi observado que as proteínas variantes de anticorpo-IL12 testadas não afetavam significativamente de forma adicional a atividade da proteína. Ab-IL12p40V1 até Ab-IL12p40V8 tinham de alguma maneira a atividade reduzida (aproximadamente 1,5 – 3 vezes menor) comparadas com a proteína de fusão anticorpo-IL-12 do tipo selvagem correspondente.

Exemplo 6: Farmacocinética das proteínas IL-12 contendo as variantes

de p40

[00106] Foi determinada a farmacocinética das proteínas de fusão com anticorpo contendo as variantes de p40. Os experimentos foram realizados utilizando técnicas padronizadas familiares aos versados na técnica. Sucintamente, camundongos BALB/c (n=3 por grupo de tratamento) receberam injeção com 25 µg de Ab-IL12 ou variantes de Ab-IL12 contando as variantes p40V1, p40V2, p40V3, p40V4, p40V5, p40V6, p40V7 e p40V8 em um volume de 0,2 mL, de forma intravenosa na veia caudal ou de forma subcutânea. Em vários pontos de tempo até 24 horas e até 96 horas, respectivamente, pequenos volumes de sangue foram tirados através do sangramento retro-orbital e coletados em tubos revestidos com heparina para prevenir a coagulação. Após a centrifugação para remover as células, o plasma foi analisado através da captura com anti-soro anti-IgG humana H&L e da detecção com um anticorpo anti-IL-12 humana. Os resultados foram normalizados com a concentração inicial no plasma de cada camundongo tirado dentro do período de 30 segundos após a injeção (t = 0). A figura 26 é uma compilação de experimentos representativos que avaliam a farmacocinética da proteína administrada de forma intravenosa. Foi descoberto que comparada com a proteína de controle do tipo selvagem, as proteínas de fusão anticorpo-IL-12 contendo as variantes p40V1 e p40V2, p40V3, p40V4, assim como p40V6, tinham valores farmacocinéticos significativamente melhorados. Particularmente, foi observado que a meia-vida da fase de distribuição (fase alfa) aproximadamente duplicou e de forma correspondente a AUC das proteínas variantes aproximadamente duplicou também. Entretanto, a fase de eliminação (fase beta) de todas as proteínas de fusão Ab-IL-12 permaneceu substancialmente similar. Estes resultados eram coerentes com a farmacocinética destas proteínas quando administradas ao camundongo de forma

subcutânea. A figura 27, painel A, mostra uma comparação de Ab-IL12 do tipo selvagem com variantes de Ab-IL12 contendo p40 V1, p40 V2, p40 V3 e p40 V4 e o painel B mostra uma comparação de Ab-IL12 do tipo selvagem com variantes de Ab-IL12 contendo p40 V5, p40 V6, p40 V7 e p40 V8.

Exemplo 7. Tratamento de um paciente humano com variantes de IL-12p40

[00107] As variantes de IL-12p40 da invenção são utilizadas para prevenir e tratar doenças e distúrbios humanos como a seguir. Em geral, o método preferido de administração é através de infusão i.v. ou de injeção i.v. ou através de injeção subcutânea, inalação, embora o fornecimento oral e outros métodos também sejam possíveis.

[00108] Um paciente com câncer de próstata metastásico avançado, com um histórico de tratamento por quimioterapia convencional, é tratado como a seguir com uma proteína de fusão anticorpo-IL12 contendo uma variante de IL-12p40. A dose da proteína de fusão anticorpo-IL12 por ciclo de tratamento é de aproximadamente 150 microgramas por kg de peso corporal e pode ser fornecida em um único dia ou dois ou três dias adjacentes, com administração através de infusão por gotejamento. O tratamento pode ser combinado com um tratamento de padrão-de-cuidado para câncer de próstata que é determinado por um médico como sendo apropriado para o paciente. Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, por exemplo, Naproxen®, também são prescritos. Os ciclos de tratamento são repetidos aproximadamente uma vez a cada três semanas.

[00109] Um paciente com câncer de mama refratário a hormônios é tratado por infusão por gotejamento com uma proteína de fusão anticorpo-IL12 contendo uma variante de IL-12p40. Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, por exemplo, Naproxen® também são prescritos.

[00110] Em uma estratégia de tratamento alternativa, um paciente com câncer de próstata refratário a hormônios avançado ou câncer de mama refratário a hormônios avançado é tratado com a proteína de fusão anticorpo-IL12 contendo uma variante de IL-12p40 aproximadamente uma vez a cada três semanas, em combinação com uma imunocitocina contendo IL-2 tal como KS-IL2. Estes dois agentes podem ser co-administrados através de infusão por gotejamento. Antes do tratamento, o paciente recebe doses com uma quantidade imunoestimuladora de ciclofosfamida. Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, por exemplo, Naproxen® também são prescritos.

[00111] Um paciente com artrite reumatoide é tratado com uma proteína de fusão Fc-p40, em que a subunidade p40 é uma variante de IL-12p40, aproximadamente uma vez a cada duas semanas a uma dose de aproximadamente 8 mg/kg, com administração através de infusão por gotejamento. É observado que a progressão da destruição de juntas é significativamente inibida pela monoterapia, mesmo quando comparada com fármacos anti-reumáticos que modificam a doença.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de IL-12 p40, caracterizada pelo fato de que compreende

(i) as substituições a seguir: Ser259Asp, Lys260Asn, Arg261Thr e Lys264Gly, e

(ii) as deleções a seguir: Lys263 e Asp265, em que as ditas posições são relacionadas à molécula do tipo selvagem não modificada de IL-12 p40 humana parental de SEQ ID NO: 2,

formando assim a linha de sequência: Lys - Asp - Asn - Thr – Glu - Gly - Arg nas posições 258 - 264 da variante de SEQ ID NO: 7.

2. Proteína IL-12, caracterizada pelo fato de que contém a variante como definida na reivindicação 1.

3. Proteína IL-23, caracterizada pelo fato de que contém a variante como definida na reivindicação 1.

4. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante como definida na reivindicação 1, ou uma proteína como definida na reivindicação 2 ou 3, e um anticorpo ou uma parte ativa do mesmo.

5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade farmacologicamente ativa de uma proteína ou proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 4, opcionalmente junto com um diluente ou excipiente veículo farmaceuticamente aceitável.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer ou de uma doença autoimune.

7. Uso de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um medicamento para o tratamento de câncer ou de uma doença autoimune.

Fig 1

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHE
DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL
CLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF
NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
(SEQ ID NO:1)

Fig 2

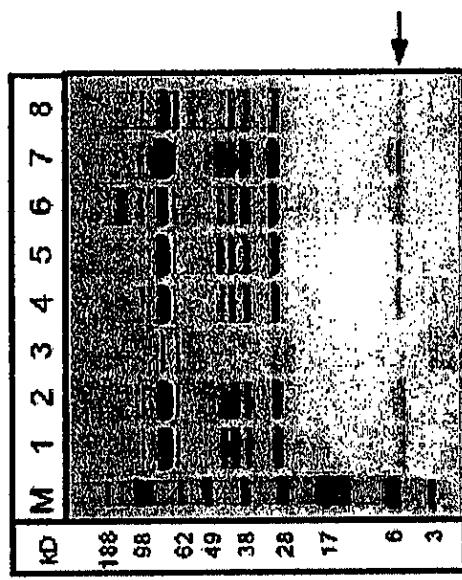
IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS (SEQ ID NO:2)

Fig 3

AVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPH
IQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRHQLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSP
VGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQ
AFVAVAARVFAHGAATLSP
(SEQ ID NO:3)

47
47

2/17



A

Fig 4A

48
Ry

3/17

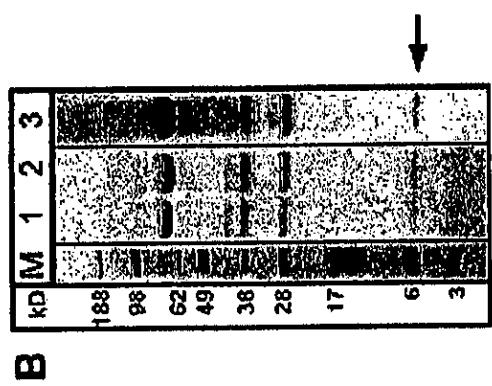


Fig 4B

4/17

Fig 5

REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
(SEQ ID NO:4)

Fig 6

KSKREKKDR
(SEQ ID NO:5)

Fig 7.1

1	I.W.E.L.K.K.D.V.Y.V.V.E.L.D.W.Y.P.D.A.P.G.E.M.V.V.L.T.C.D.T.P.E.E.D.G.I.T.W.T.L.D.Q.S.S.E.V.L.G.S.G.K.T.L.T.I.Q.V.K.E.P	p40	ser humano
1G.....	p40	babuíno
1G.....	p40	rhesus
1G.....	p40	mangabei
1E.....H.....H.....D.....SA.....	p40	cachorro
1E.....H.....D.....S.....	p40	gato
1E.....N.....H.....D.....S.....SA.....N.....	p40	cavalo
1E.....N.....N.....N.....S.....T.....H.....	p40	porco
1	M.....E.....N.....T.....S.....	p40	vaca
1E.....N.....I.....T.....S.....	p40	búfalo d'água
1E.....N.....N.....T.....S.....	p40	cabra
1E.....N.....N.....T.....S.....	p40	ovelha
1E.....N.....T.....R.....S.....	p40	cervo
1E.....N.....V.....S.....A.....R.....S.....D.....I.....S.....KN.....AV.....	p40	hamster
1	M.....H.T.....T.....N.A.....S.R.K.D.I.....	p40	porquinho-da-índia
1E.....V.....S.G.....R.....S.....D.....I.....S.....V.....IV.....	p40	rato do algodão
1	M.....E.....V.....R.....T.T.....S.....D.....S.....R.R.G.I.....T.R.....	p40	rato
1	M.....E.....V.....T.....T.N.....D.....S.....R.H.G.I.....T.....	p40	camundongo
61	G.D.A.G.Q.Y.T.C.H.K.G.E.V.I.S.H.S.L.L.L.H.K.K.E.D.G.I.W.S.T.D.I.L.K.D.Q.K.E.P.K.N.K.T.P.L.R.C.E.A.K.N.Y.S.G.R.F.T.C	p40	ser humano
61A.....V.....	p40	babuíno
61A.....V.....	p40	rhesus
61A.....P.....E.....I.....	p40	mangabei
61K.....R.....I.....E.....S.....I.....K.....	p40	cachorro
61	A.....F.....I.....RE.....S.....I.....K.....	p40	gato
61W.....H.....S.....K.....	p40	cavalo
61R.....A.....Q.....S.....K.....	p40	porco
61A.....R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	vaca
61A.....R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	búfalo d'água
61R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	cabra
61R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	ovelha
61R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	cervo
61R.....A.....S.....K.....D.....H.....	p40	hamster
61	SN.....KT.....R.....N.....D.....K.....A.....	p40	porquinho-da-índia
61	E.....G.....R.Q.....E.....E.....GS.N.G.....K.....R.S.....	p40	rato do algodão
61	S.....T.....R.....D.....K.....A.....	p40	rato
61	L.....R.....T.....H.....N.....E.....N.....F.....K.....P.....	p40	camundongo
61	L.....T.....H.....N.....E.....N.....F.....K.....P.....	p40	
121	W.W.L.T.T.I.S.T.D.L.T.F.S.V.K.S.S.R.G.S.S.D.P.Q.Q.V.T.C.G.A.A.T.L.S.A.E.R.V.R.G.D.N.K.E.Y-E.Y.S.V.E.C.Q.E.D.S.A.C.P.A	p40	ser humano
121N.....V.....	p40	babuíno
121N.....V.....	p40	rhesus
121S.....II.....N.....	p40	mangabei
121A.....K.....F.....V.....V.....RD.....KK.....T.....G.....S	p40	cachorro
121A.....K.....T.....K.....V.....RD.....KK.....T.....G.....	p40	gato
121A.....K.....R.....SV.....DR.....KK.....T.....G.....	p40	cavalo
121A.....K.....T.....R.....ED.L.G.....KK.....R.....G.....	p40	porco
121A.....K.....R.....L.....K.....S.L.E.H.R.....NK.....T.....G.....	p40	vaca
121A.....K.....A.....R.....S.....K.....S.V.....HR.....NK.....T.....G.....T.....	p40	búfalo d'água
121	S.....A.....N.K.....R.....S.....K.....S.M.....HR.....NK.....T.....G.....	p40	cabra
121	S.....A.....N.K.....R.....S.....K.....S.M.....HR.....NK.....T.....G.....	p40	ovelha
121A.....K.....R.....S.....T.....K.....IV.....HR.....KK.....T.....G.....	p40	cervo
121A.....K.N.....SS.....S.R.A.....S.....K.....T.V.....R.D.....Q.K.....A.....IT.....T	p40	hamster
121A.F.G.....V.K.....G.....S.....E.....S.....Q.....-K.....T	p40	porquinho-da-índia
121A.V.....K.....L.....S.S.....S.R.S.....S.....T.....K.....T.V.....Q.R.D.....N.K.....A.....IT.....T	p40	rato do algodão
118	S.....V.H.R.N.....K.N.I.....S.S.....P.E.S.R.A.....R.S.....K.....T.L.N.Q.R.D.....E.K.....A.....V.T.....T	p40	rato
118	S.....V.Q.R.N.M.....K.N.I.....S.S.....P.S.R.A.....M.S.....K.....T.L.....Q.R.D.....E.K.....S.....V.T.....T	p40	camundongo

6/17

Fig 7.2

180 ASES LPIE VMV DAV HKL KYEN YTSSFF FIR DII KPD PPK NLQ KPL KNS RQVE VSWEY PDT p40 ser humano
 180 ...R.....I.....A.....p40 babuino
 180 ...R.....I.....p40 rhesus
 180 ...R.....I.....p40 mangabei
 181V..I.....T.....H.....p40 cachorro
 181V..I.....H.....p40 gato
 181IV.....G.....E.....p40 cavalo
 176VLE.....N.....H..I.....p40 porco
 181L..V.E.....R.....p40 vaca
 181L..V.E.....p40 bôfalo d'água
 181VME.....R.....p40 cabra
 181VME.....R.....p40 ovelha
 181V.E.....R.....p40 cervo
 181T..GLVME.Q..Y.....STG.....RG..M.L.....S p40 hamster
 176V..I..F.....Y.....SV..Q.....p40 porquinho-da-índia
 181T..LVME.Q..Y.....STG.....S.....S p40 rato do algodão
 178T..LV.B.QQON.....ST.....V.....S p40 rato
 178T..LALB.RQON.....ST.....M.....S p40 camundongo

240 WSTPHSYPSLTFCVQVQG--KSKREKKDR-----VP-TDKTSATVICRKNASISVR p40 ser humano
 240I.....I.....F..Q p40 babuino
 240I.....I.....F..Q p40 rhesus
 240I.....I.....P..Q p40 mangabei
 241A.--NN.....LC-V.....K.V.H.D.K.R.Q p40 cachorro
 241G.--NN.....LS-V.....K.V.H.D.K.R.Q p40 gato
 241S1.....N.K.R.....L.-M.E.....T.H.DGQ.R.Q p40 cavalo
 236M.G.....N.....K.....L..QI..K.T.H.D.N.R.Q p40 porco
 241N.....L.-M.Q.....K.T.H.D.N.R.Q p40 vaca
 241N.....L.-M.Q.....K.T.H.D.N.R.Q p40 bôfalo d'água
 241N.....L..Q.....K.T.H.D.N.R.Q p40 cabra
 241N.....L..Q.....K.T.H.D.N.R.Q p40 ovelha
 241N.....L..Q.....K.T.H.D.N.R.Q p40 cervo
 241N.....L..M.Q.....K.T.H.D..R.Q p40 hamster
 240K.H..HR.....R..ES.....Q..V.....IR.S.G.EVR.. p40 porquinho-da-índia
 236L..TH.KN.NR.....YE.....L.....S.H.ISKVE.. p40 rato do algodão
 240K.F..YR.....K..GES.....LLV..P..KIR.S.GGBVR.. p40 rato
 237K.F.RI.R.....K..TKETEEBCNQKGA.LVE.....E.Q..G.N.C.Q p40 camundongo
 237K.F.RI.R.....K..MKETEBGCNQKGA.LVE..T.E.Q..GGNVC.Q p40 camundongo

292 AQDRYYSSSSWSEWASVPCS
 292p40 ser humano (SEQ ID NO:2)
 292p40 babuino (SEQ ID NO:27)
 292p40 rhesus (SEQ ID NO:28)
 292p40 mangabei (SEQ ID NO:29)
 293 ..R.....D..S..p40 cachorro (SEQ ID NO:30)
 293 ..R.....N..S..p40 galo (SEQ ID NO:31)
 293 ..R.....S..p40 cavalo (SEQ ID NO:32)
 288 ..R.....S.Np40 porco (SEQ ID NO:33)
 291 ..R.....F.....S..p40 vaca (SEQ ID NO:34)
 291 ..R.....F.....S..p40 bôfalo d'água (SEQ ID NO:35)
 291 ..R.....F.....S..p40 cabra (SEQ ID NO:36)
 291 ..R.....F.....S..p40 ovelha (SEQ ID NO:37)
 291 ..R.....N.F.....S..p40 cervo (SEQ ID NO:38)
 291 ...H..N.....R.V.....p40 hamster (SEQ ID NO:39)
 290 ..R.....S..EVSVERp40 porquinho-da-índia (SEQ ID NO:40)
 291 ...H..N.....S.Np40 rato do algodão (SEQ ID NO:41)
 296N..C.K.TC...RGRSp40 rato (SEQ ID NO:42)
 296N..C.K..C...RVRS p40 camundongo (SEQ ID NO:43)

7/17

Fig 8

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKDNTERVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEASV
PCS
(SEQ ID NO:6)

Fig 9

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKDNTERVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEASV
VPCS
(SEQ ID NO:7)

Fig 10

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGQDQDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS
(SEQ ID NO:8)

Fig 11

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNYSRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGQDQDESGDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS
(SEQ ID NO:9)

8/17

Fig 12

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLTDQSSEVLGSG
 KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSSLHHKKEDGIWSTDILKDQKE
 PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
 ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
 YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
 FCVQVQGKSKA**EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW**
 ASVPCS
 (SEQ ID NO:10)

Fig 13

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLTDQSSEVLGSG
 KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSSLHHKKEDGIWSTDILKDQKE
 PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
 ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
 YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
 FCVQVQGKSA**EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW**
 ASVPCS
 (SEQ ID NO:11)

Fig 14

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLTDQSSEVLGSG
 KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSSLHHKKEDGIWSTDILKDQKE
 PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
 ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
 YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
 FCVQVQGKS**A****EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW**
 ASVPCS
 (SEQ ID NO: 12)

Fig 15

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLCDTPEEDGITWLTDQSSEVLGSG
 KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSSLHHKKEDGIWSTDILKDQKE
 PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
 ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
 YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
 FCVQVQGKSG**RE****EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW**
 ASVPCS
 (SEQ ID NO: 13)

9/17

Fig 16

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSQREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW
ASVPCS
(SEQ ID NO:14)

Fig 17

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSKDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW
ASVPCS
(SEQ ID NO:15)

Fig 18

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKE
PKNKTFLRCEAKNSGRFTCWLTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA
ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYEN
YTSSFFIRDIICKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
FCVQVQGKSQDEKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSWSEW
ASVPCS
(SEQ ID NO:16)

10/17

Fig 19

ATGTGTCAACCAGCAGTTGGTCATCTGGTTTCCCTGGTTTCTGGCATCTCCCTCGGG
CCATATGGGAACTGAAGAAAAGATGTTATGTCGTAGAATTGGATTGGATCCGGATGCCCTGG
AGAAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTGGACCAAG
AGCAGTGAGGTCTAGGCTCTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTGGAGATGCTG
GCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCTGCTGCTTCACAAAAAA
GGAAGATGGAATTGGTCCACTGATATTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTT
CTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTA
CTGATTGACATTCACTGTCAAAAGCAGCAGAGGCTCTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGG
AGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAG
TGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCGCCATTGAGGTATGGTGGATG
CCGTTACAAGCTCAAGTATGAAAACATACACCAGCAGCTTTCATCAGGGACATCATCAAACC
TGACCCACCCAAGAACCTTGAGCTGAAGCCATTAAAAGAATTCTGGCAGGTGGAGGTCAGCTGG
GAGTACCCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGCTTCAGGTCC
AGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGGCCACGGTCAT
CTGCCGCAAAATGCCAGCATAGCGTGCAGGCCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATTTGGAGC
GAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTTAG
(SEQ. ID. NO: 21)

(558 22 20727)

Fig 20

(SEQ ID NO:22)

Fig 21

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAAGCTGGGAGTACCCCTGACACCTGGAGCAGTCCACATTCTAC
TTCTCCCTGACATTCTCGCGTTCAAGGTCCAGGGCCAGGATCAGGACGAGAAGAAGGATAGAGTC
TCTTTTTTTTgaagactcaATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAAGCTGGGAGTACCCCTGACACTG
GAGTACTCCACATTCCCTACTTCTCCCTGACATTCTCGCGTTCAAGGTCCAGGGCCAGGATCAGGAC
GAGTCCGGAGATAGAGTCTTC
(SEQ ID NO: 23)

Fig 42

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTGGGAGTACCTGACACCTGGGACACCTCACCTTCAGTCT
TTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGGCAGAAAAGAAAGATAGAGTCT
TCACGGACAAGACCTCAGCttttttttttgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGTTG
GGAGTACCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTC
CAGGGCAAGAGCGCAGCTGAAAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGC
(SEQ ID NO: 24)

11/17

Fig 23

GAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAAGTTGGGAGTACCCCTGACACCTGGAGCACTCCACATTCCCTAC
TTCTCCCTGACATTCTGGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCGCCCGGGAAAAGAAAGATAGAGTCT
TCACGGACAAGACCTCAGCtttttttttgaagactcAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAAGTTG
GGAGTACCCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCAGGTC
CAGGGCAAGAGCGGTAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTACGGACAAGACCTCAGC
(SEQ ID NO:25)

12/17

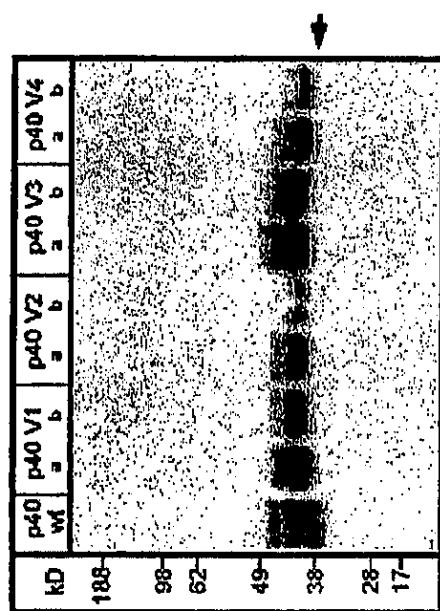


Fig 24

58

13/17

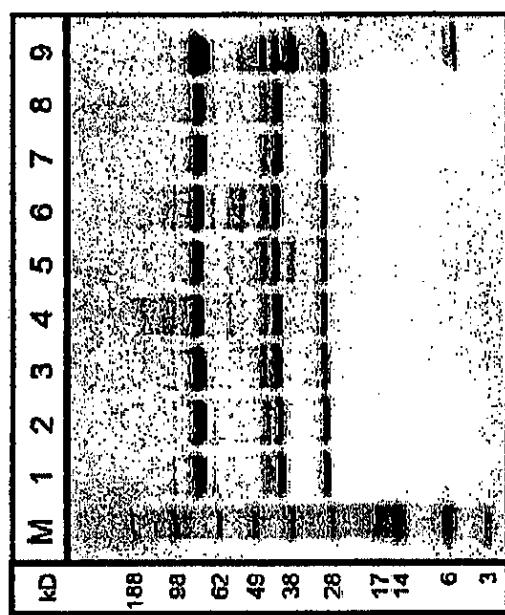


Fig 25

14/17

Farmacocinética de Variações de Ab-IL12 (i.v.)

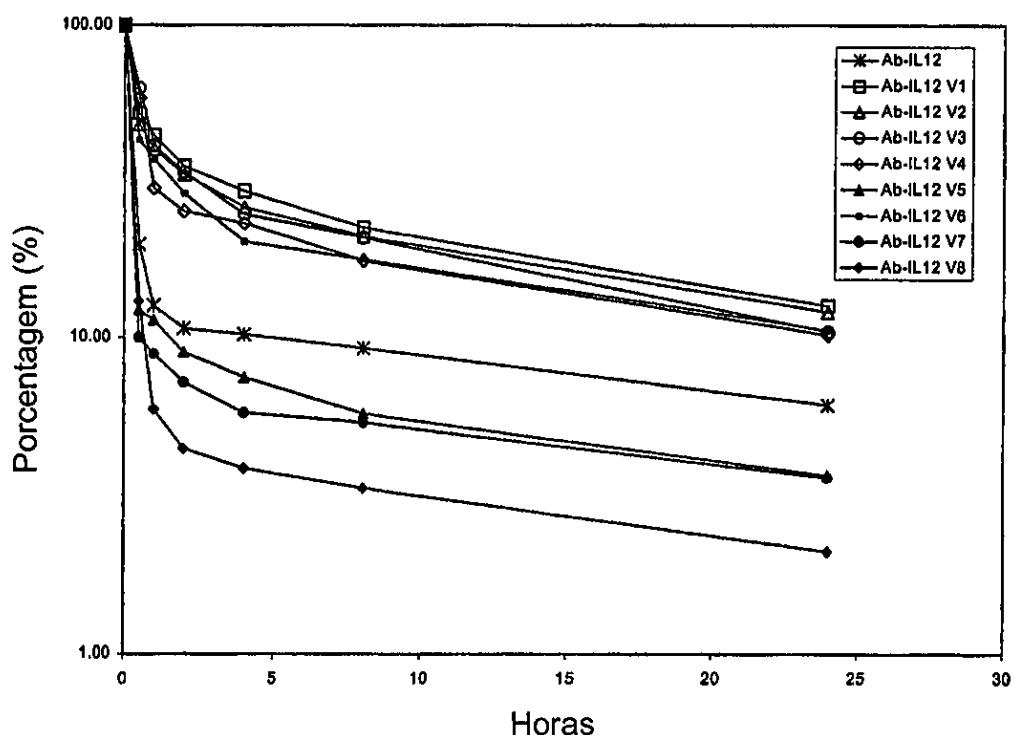


Fig 26

15/17

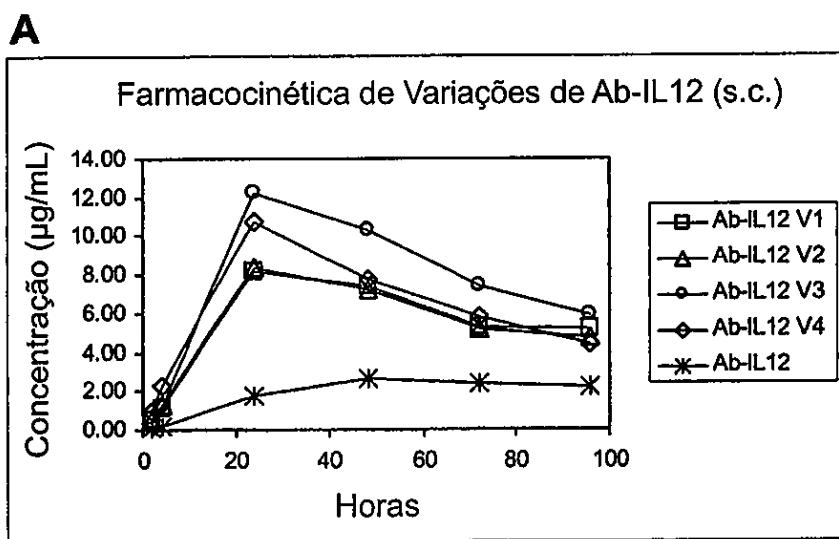


Fig 27A

16/17

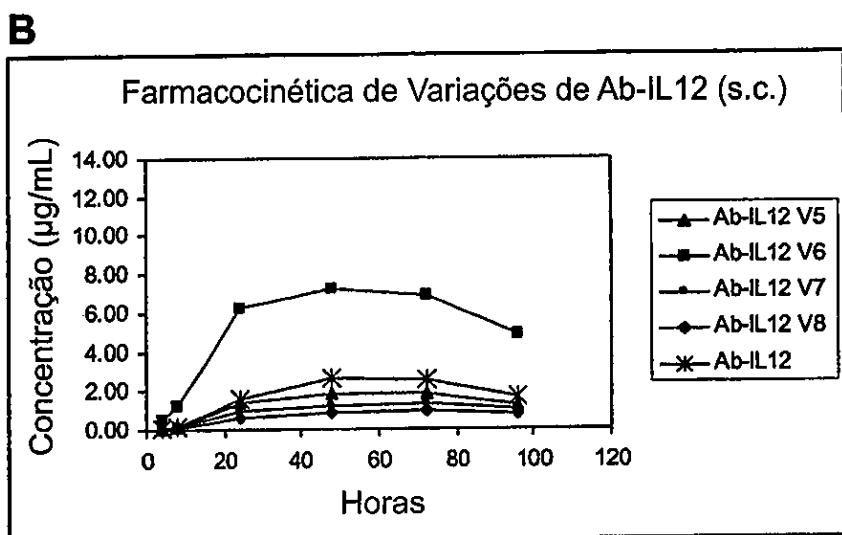


Fig 27B

17/17

Fig 28

IWELKKDVVVVVELDWYPNAPGETVVLTCDTPEEDGITWTSQDSSEVLGTGKTLTIHVKEFGDAG
QYTCKRGGEALSRSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKSFLKCEAKNYSGRFTCWWLTTIST
DLKFSVKSSRGSTDPRGVTCGTATLSEDLGEYKKYRVECQEGSACPAAEESLPIEVVLEAVHKL
KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRHVEVSWGYPDTWSTPHSYFSLTFCIQVQGKSK
REKKDRIFTDKTSATVICRKNAKIRVQARDRYYSSFWSEWASVSCS
(SEQ ID NO:44)