

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 284 242**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)**C12N 5/20** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C12P 21/08** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99904780 .6**(86) Fecha de presentación : **15.01.1999**(87) Número de publicación de la solicitud: **1049717**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2000**(54) Título: **Anticuerpos contra IL-12 humana.**(30) Prioridad: **23.01.1998 US 72333 P**(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007(72) Inventor/es: **Gately, Maurcie, Kent y
Presky, David, Howard**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra IL-12 humana.

5 Esta invención se refiere generalmente a anticuerpos para IL-12 y más particularmente a anticuerpos policlonales y monoclonales anti-IL-12 humana.

10 La interleuquina-12 (IL-12), primeramente conocida como factor de maduración de linfocitos citotóxicos o factor estimulante de células asesinas naturales, es una citoquina heterodímera de 75 kDa (p75) compuesta por subunidades de 40 kDa (p40) y 35 kDa (p35) unidas por disulfuro. Las subunidades p40 y p35 son polipéptidos que contienen 306 residuos de aminoácido y 197 residuos de aminoácido, respectivamente (Gubler U. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, 4143-4147 (1991)).

15 El heterodímero p75 es la forma biológicamente activa de IL-12 (Gubler, U. y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4143; Wolf, S.F. y otros, 1991, J. Immunol., 146: 3074). El heterodímero p75 de IL-12 tanto activa como refuerza respuestas inmunitarias mediadas por células contra抗igenos extraños estimulando la producción de células cooperadoras Th 1, estimulando células T activadas y células asesinas naturales (NK), potenciando la actividad lítica de células NK/LAK y estimulando la producción de IFN- γ por células T y NK en reposo y activadas.

20 Se ha observado que la subunidad p40 de IL-12 es producida en exceso de la subunidad p35 y se encuentra en las formas tanto monómérica como dímera (Podlaski, F.J. y otros, 1992, Arch. Biochem. Biophys. 294: 230; D'Andrea, A. y otros, 1992, J. Exp. Med., 176: 1387). El homodímero p40 de IL-12 es un potente antagonista de IL-12 (Ling, P. y otros, 1995, J. Immunol., 154: 116; Gillessen, S. y otros, 1995, Eur. J. Immunol., 25: 200). En contraste con la subunidad p40, la subunidad p35 de IL-12 no tiene actividad biológica conocida y la proteína p35 solo se ha encontrado en 25 asociación con la subunidad p40 como parte del heterodímero p75 de IL-12. Por lo tanto, existen dos tipos importantes de epítopos presentados por IL-12 humana: (1) epítopos presentados por la subunidad p40 y (2) epítopos presentados por la conformación tridimensional del heterodímero p75 de IL-12. Por consiguiente, los presentes inventores diseñan anticuerpos que reconocen epítopos presentes sobre la proteína heterodímera p75 de IL-12 pero no reconocen epítopos presentes sobre la proteína de la subunidad p40 de IL-12 llamados anticuerpos "específicos para el heterodímero".

30 D'Andrea y otros describen la producción de factor estimulante de células asesinas naturales (IL12) mediante células mononucleares de sangre periférica (Journal of Experimental Medicine. 1992, Vol. 176. Nº 5, pp 1387-1389).

35 En WO95/24918A se describe un método para tratar en un mamífero un estado autoinmune, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-12.

40 Se ha encontrado que los anticuerpos para IL-12 no son óptimamente eficaces para neutralizar substancialmente la bioactividad de IL-12. Los anticuerpos para IL-12 que reaccionan inmunológicamente con la subunidad p40 no bloquean óptimamente la bioactividad de IL-12 humana. Por ejemplo, el uso de anticuerpos que reaccionan con epítopos presentados por la subunidad p40 es particularmente problemático debido a que se ha observado que la producción de heterodímero p75 de IL-12 da como resultado un exceso de subunidades p40 inactivas con relación al heterodímero p75 bioactivo (Podlaski, F.J., 1992, Arch. Biochem. Biophys. 294: 230; D'Andrea, A. y otros, 1992, J. Exp. Med., 176: 1387). Como resultado, los anticuerpos para p40 no son tan eficaces como los anticuerpos específicos para el heterodímero para reducir los efectos perjudiciales de la IL-12 debido a que la subunidad p40 sola no es bioactiva, y 45 los anticuerpos para p40 tienden a unirse a las subunidades p40 inactivas en vez de a aquellas subunidades p40 que son parte de un heterodímero p75 bioactivo.

50 Ni siquiera los anticuerpos conocidos que reaccionan solo con el heterodímero p75 neutralizan eficazmente la bioactividad de IL-12. Por ejemplo, un anticuerpo específico para el heterodímero p75 de IL-12 previamente identificado, llamado 20C2 (Chizzonite y otros, Cytokine, 6: A82a (1994) y D'Andrea y otros, J. Exp. Med., Vol. 176, 1387-1398 (1992)), no puede bloquear substancialmente la proliferación de linfoblastos activados por PHA ni la producción de IFN- γ estimuladas por IL-12 humana.

55 Anticuerpos específicos para el heterodímero que neutralicen más eficazmente la bioactividad de IL-12 son necesarios para reducir efectos perjudiciales de IL-12. Se sabe que los niveles incrementados de IL-12 en suero o tejido están implicados en el desarrollo y el avance de trastornos autoinmunes. Así, los anticuerpos para IL-12 son antagonistas útiles para controlar enfermedades con patologías que están mediadas a través de mecanismos inmunes, particularmente enfermedades asociadas con actividad de células cooperadoras tipo Th1 aberrantes. Ejemplos de tales trastornos autoinmunes incluyen esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, artritis reumatoide y diabetes mellitus autoinmune. Otros estados patológicos que se ha observado que se benefician de la administración de anticuerpos para IL-12 incluyen enfermedad del trasplante/injerto contra el huésped y choque séptico.

60 De acuerdo con esta invención, se ha encontrado que anticuerpos para IL-12 obtenidos de un mamífero deficiente en el gen que codifica la subunidad p35 y/o el gen que codifica la subunidad p40 neutralizan substancialmente la bioactividad de IL-12.

ES 2 284 242 T3

De acuerdo con esta invención, por primera vez, se producen anticuerpos que neutralizan substancialmente la bioactividad de IL-12 humana usando los métodos descritos aquí. A diferencia de otros anticuerpos específicos para el heterodímero p75 de IL-12, los anticuerpos específicos para el heterodímero de la presente invención neutralizan al menos 90% de la bioactividad de IL-12 humana. Además, los anticuerpos específicos para el heterodímero p75 de IL-12 de la presente invención reaccionan cruzadamente con IL-12 de mono Rhesus.

Los anticuerpos para IL-12 específicos para el heterodímero p75 descritos aquí son agentes terapéuticos eficaces para el uso en el bloqueo de la bioactividad de IL-12 para tratar estados mediados por respuestas inmunológicas estimuladas por IL-12 no deseables. Los anticuerpos para IL-12 específicos para el heterodímero altamente neutralizadores descritos aquí son inhibidores particularmente útiles de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 y la producción de IFN- γ por linfoblastos humanos activados por PHA.

La Fig. 1 es una gráfica que muestra la captura de IL-12 humana marcada con ^{125}I por anticuerpos contenidos en sobrenadantes de hibridomas HIL-12F3-5F2 (denominado aquí “5F2”), HIL-12F3-16F2 (denominado aquí “16F2”), HIL-12F3-16G2 (denominado aquí “16G2”), HIL-12F3-20E11 (denominado aquí “20E11”) y HIL-12F1-17E2 (denominado aquí “17E2”) (barras abiertas). La presencia de la subunidad p40 de IL-12 humana no marcada durante la reacción de inmunoprecipitación (barras sólidas) no bloqueaba la captura de IL-12 humana marcada con ^{125}I por anticuerpos monoclonales 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11, demostrando que estos anticuerpos no tienen alta afinidad para la subunidad p40 de IL-12 sola.

La Fig. 2 muestra patrones de enfoque isoelectrónico de anticuerpos monoclonales anti-IL-12 humana específicos de heterodímero p75, 20C2, 16G2, 16F2, 20E11 y 5F2. Según se muestra en la Fig. 2, los anticuerpos monoclonales 20C2, 20E11 y 5F2 son inmunoglobulinas únicas. Los anticuerpos monoclonales 16G2 y 16F2 aparecen idénticos mediante enfoque isoelectrónico, pero ambos son diferentes de 20C2, 20E11 y 5F2.

La Fig. 3 es una gráfica que muestra la inhibición de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 humana natural por anticuerpos monoclonales para IL-12 específicos para el heterodímero p75 20C2 (+), 16G2 (Δ), 16F2 (\circ), 20E11 (+) y 5F2 (\blacktriangle). La inhibición de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 humana natural se determinó con respecto al nivel de 0,25 ng/ml de proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 humana en ausencia de anticuerpos para IL-12, mostrado en la Fig. 3 como una línea punteada horizontal a 9940 cpm, y niveles de fondo de proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA, es decir, en ausencia tanto de IL-12 como de anticuerpos para IL-12, mostrados en la Fig. 3 como una línea punteada horizontal a 1480 cpm. Según se muestra en la Fig. 3, los anticuerpos monoclonales para IL-12 16G2 (Δ), 16F2 (\circ), 20E11 (+) y 5F2 (\blacktriangle) inhiben la proliferación de linfoblastos activados por PHA estimulada por 0,25 ng/ml de IL-12 humana en al menos 90%. En contraste, según se muestra en la Fig. 3, el anticuerpo 20C2 (+) previamente conocido no inhibe substancialmente la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra la inhibición de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 de mono Rhesus por anticuerpos monoclonales para IL-12 específicos para el heterodímero p75 16G2 (Δ), 16F2 (\circ), 20E11 (+) y 5F2 (\blacktriangle) de la presente invención en comparación con el anticuerpo 20C2 (+) previamente conocido. El nivel de proliferación de linfoblastos en presencia de 0,5 ng/ml de IL-12 de mono Rhesus y en ausencia de anticuerpos para IL-12 está representado por la línea punteada horizontal en el extremo superior de la gráfica. El nivel de fondo de proliferación de linfoblastos, es decir, en ausencia tanto de IL-12 como de anticuerpos para IL-12, está representado por una línea punteada horizontal en el extremo inferior de la gráfica. Según se muestra en la Fig. 4, los anticuerpos de la presente invención son potentes inhibidores de la proliferación de linfoblastos activados por PHA estimulada por IL-12 de mono Rhesus, en contraste con el anticuerpo 20C2 (+) que tiene un efecto inhibidor mínimo sobre la proliferación de linfoblastos estimulada por IL-12 de mono Rhesus.

La Fig. 5 es una gráfica que muestra la inhibición de la producción de IFN- γ por anticuerpos monoclonales específicos para el heterodímero p75, 16F2 (\circ), 16G2 (\blacksquare), 20E11 1 (\blacktriangle), 5F2 (\bullet) y 20C2 (*). Según se muestra en la Fig. 5, los anticuerpos 16F2 (\circ), 16G2 (\blacksquare), 20E11 (\blacktriangle) y 5F2 (\bullet) inhiben la producción de IFN- γ estimulada por 0,25 ng/ml de IL-12 humana en al menos 90%. La línea horizontal punteada en el extremo inferior de la gráfica representa la producción de IFN- γ de fondo en ausencia de IL-12. En contraste, según se muestra en la Fig. 5, el anticuerpo monoclonal 20C2 (*) es incapaz de inhibir la producción de IFN- γ estimulada por 0,25 ng/ml de IL-12 en más de 65%.

La Fig. 6 es una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 16G2 específico para el heterodímero p75 y la secuencia de aminoácidos deducida de esta secuencia de nucleótidos.

La Fig. 7 es una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 20E11 específico para el heterodímero p75, y la secuencia de aminoácidos deducida de esta secuencia de nucleótidos.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que cuando se producen anticuerpos para IL-12 a partir de mamíferos deficientes en el gen que codifica la subunidad de IL-12 p35 y/o el gen que codifica la subunidad de IL-12 p40, se obtienen anticuerpos para IL-12 que reaccionan inmunológicamente de forma selectiva con epítopos del

ES 2 284 242 T3

heterodímero p75 de IL-12 y se identifican por su capacidad para reaccionar inmunológicamente de forma selectiva con el heterodímero p75 de IL-12 humana, pero no reaccionar inmunológicamente con la subunidad p40 sola.

A diferencia de anticuerpos para p75 de IL-12 previamente conocidos, se producen mediante los métodos descritos 5 aquí anticuerpos que neutralizan substancialmente la bioactividad de IL-12 humana, es decir, neutralizan al menos aproximadamente 90% de la bioactividad de IL-12 humana. Además, los anticuerpos específicos para el heterodímero p75 de IL-12 de la presente invención reaccionan cruzadamente con IL-12 de mono Rhesus.

Los anticuerpos para IL-12 descritos aquí neutralizan al menos aproximadamente 90% de la bioactividad de IL-10 12 humana inhibiendo al menos aproximadamente 90% de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA inducida por IL-12 a concentraciones de al menos aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y/o inhibiendo al menos aproximadamente 90% de la producción de IFN- γ estimulada por IL-12 por linfoblastos humanos activados por PHA a concentraciones de al menos aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por otra parte, se ha observado que los anticuerpos descritos aquí inhiben especialmente la proliferación inducida por IL-12, pero no inducida por IL-2, de linfoblastos humanos 15 activados por PHA. Los linfoblastos humanos activados por PHA se preparan como sigue. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron (Gately y otros, J. Natl. Cancer Inst., 69:1245 (1982)) y se estimularon con PHA-P (Difco Labs., Detroit, MI) al 0,1%. Despues de 3 días, los cultivos se dividieron 1:1 con medio reciente y 50 U/ml de IL-2 humana según se describe en Gately, M.K., Chizzonite, R. y Presky, D.H., Measurement of human and mouse interleukin 12, *Current Protocols in Immunology*, vol. 1. J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. 20 Shevach y W. Strober, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995, pp. 6.16.1-6.16.15. Los linfoblastos activados por PHA se usaron despues de un período de incubación adicional de un día.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos para IL-12 se identifican por su capacidad para unirse selectivamente al epítopo presentado por el heterodímero p75, pero no reaccionan inmunológicamente con ningún epítopo 25 presentado por la subunidad p40. Esta selectividad se define por el hecho de que los anticuerpos IL-12 de esta invención reaccionarán, a una cierta concentración mínima, con un epítopo solamente presentado por una cantidad dada del heterodímero p75 pero no reaccionarán a esa concentración con un epítopo presentado por la subunidad p40 de esa misma cantidad dada de este heterodímero p75. De este modo, los anticuerpos de esta invención tienen una afinidad superior para un epítopo presentado solamente por el heterodímero p75 que cualquier epítopo presentado por la 30 subunidad p40. Puede usarse cualquier ensayo convencional para identificar la unión selectiva de los anticuerpos al heterodímero p75. Generalmente, en tal ensayo, los anticuerpos se incuban con heterodímero p75 de IL-12 humana para determinar si los anticuerpos se unen al heterodímero p75. Los anticuerpos también se incuban con heterodímero p75 de IL-12 humana en presencia y ausencia de la subunidad p40 para determinar si la presencia de la subunidad 35 p40 bloquea la unión del anticuerpo o la captura del heterodímero p75. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de inmunoprecipitación competitiva (véase el Ejemplo 7 aquí) para demostrar que los anticuerpos descritos aquí reaccionan inmunológicamente de forma selectiva con el heterodímero p75 de IL-12 humana, pero no son inmunológicamente reactivos con la subunidad p40 sola.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos para IL-12 descritos aquí se producen a través del uso de 40 mamíferos con inactivación total de expresión ("knock-out"). Los mamíferos con inactivación total de expresión son deficientes en el gen que codifica la subunidad p35 y/o el gen que codifica la subunidad p40 de IL-12 y así no expresan el heterodímero p75 de IL-12. Cuando se inmuniza con el heterodímero p75 de IL-12, el mamífero con inactivación total de expresión deficiente en la subunidad p35 de IL-12 y/o deficiente en la subunidad p40 de IL-12 reconoce el 45 heterodímero p75 de IL-12 como extraño y produce anticuerpos para el mismo. Preferiblemente, el mamífero con inactivación total de expresión es un ratón. De acuerdo con la presente invención, los mamíferos con inactivación total de expresión se producen mediante métodos que se han descrito en la técnica. Los mamíferos con inactivación total de expresión pueden producirse por medios convencionales tales como mutación del gen que codifica la subunidad de IL-12 p35 y/o la subunidad de IL-12 p40. Por ejemplo, ratones que tienen una mutación en el gen de la subunidad p35 de IL-12 pueden producirse como se describe por Mattner, F. y otros, Eur. J. Immunol., 26:1553-1559 (1996). Ratones 50 que tienen una mutación en el gen de la subunidad p40 de IL-12 pueden producirse como se describe por Magram, J. y otros, *Immunity*, 4: 471-481 (1996).

De acuerdo con la presente invención, anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan inmunológicamente de forma selectiva con el heterodímero p75 de IL-12 humana se producen a partir de células activadas del mamífero 55 con inactivación total de expresión mediante cualquier medio convencional conocido en la técnica. Generalmente, los anticuerpos se producen (a) inmunizando un mamífero con inactivación total de expresión deficiente en un gen que codifica la subunidad p35 y/o la subunidad p40 con heterodímero p75 humano para producir anticuerpos; (b) obteniendo anticuerpos del mamífero inmunizado; y (c) rastreando los anticuerpos con respecto a su capacidad para unirse selectivamente al epítopo presentado por el heterodímero p75 para obtener los anticuerpos que se unen selectivamente.

60 Los anticuerpos monoclonales para IL-12 de la presente invención que reaccionan inmunológicamente de forma selectiva con el heterodímero p75 de IL-12 humana se producen generalmente mediante un método que incluye las siguientes etapas:

65 (1) inmunizar a un mamífero con inactivación total de expresión, tal como, por ejemplo, un ratón deficiente en el gen que codifica la subunidad p35 de IL-12 y/o la subunidad p40 de IL-12, con heterodímero p75 de IL-12 humana;

ES 2 284 242 T3

- (2) seleccionar células del mamífero con inactivación total de expresión inmunizado que se han activado para expresar anticuerpos contra IL-12, tales como esplenocitos o células de nódulos linfáticos;
- 5 (3) fusionar las células recogidas con células de mieloma para formar células de hibridoma;
- (4) seleccionar células de hibridoma que secretan anticuerpos que reconocen IL-12 humana, por ejemplo, probando medio acondicionado para hibridomas con respecto a la presencia de anticuerpos anti-IL-12 humana; por ejemplo, a través del uso de ELISA o ensayos de inmunoprecipitación que emplean IL-12 humana marcada o no marcada; y
- 10 (5) determinar si los anticuerpos son específicos para el heterodímero p75 demostrando que los anticuerpos reaccionan inmunológicamente con un epítopo del heterodímero de IL-12 p75, pero no son inmunológicamente reactivos con ningún epítopo de la subunidad p40, incubando los anticuerpos con heterodímero p75 de IL-12 humana para determinar si los anticuerpos se unen al heterodímero p75, y a continuación incubando los anticuerpos con heterodímero p75 de IL-12 humana en presencia y ausencia de la subunidad p40 para determinar si la presencia de la subunidad p40 bloquea la unión o la captura por el anticuerpo del heterodímero p75. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de inmunoprecipitación competitiva (véase el Ejemplo 7 aquí) para demostrar que los anticuerpos descritos aquí reaccionan inmunológicamente de forma selectiva con el heterodímero p75 de IL-12 humana, pero no son inmunológicamente reactivos con la subunidad p40 sola.
- 15
- 20

El método para producir los anticuerpos monoclonales para IL-12 específicos para el heterodímero p75 de la presente invención puede comprender además la etapa de determinar la capacidad de los anticuerpos para IL-12 específicos para el heterodímero para inhibir la bioactividad de IL-12 tanto humana como de mono Rhesus en cualquier sistema de ensayo *in vitro* o *in vivo* para la bioactividad de IL-12, tal como ensayos para determinar la proliferación estimulada por IL-12 de linfocitos activados, la producción estimulada por IL-12 de IFN- γ o la potenciación estimulada por IL-12 de la actividad citolítica.

Los anticuerpo anti-IL-12 humana de la presente invención pueden aislarse hasta una forma substancialmente pura mediante métodos estándar conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, precipitación con sulfato amónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico.

Variaciones del método para obtener los anticuerpos de la presente invención que están bajo el alcance de las reivindicaciones también están abarcadas dentro de la presente invención. Métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, transferencia Western, ensayos de inmunoprecipitación competitiva o ensayos de unión de bloqueo cruzado pueden usarse para determinar si los anticuerpos son específicos para el heterodímero p75.

Además de ratones, mamíferos tales como ratas y conejos deficientes en el gen de la subunidad p35 de IL-12 y/o el gen de la subunidad p40 de IL-12 pueden inmunizarse con el heterodímero p75 de IL-12 para producir los anticuerpos descritos aquí. La deficiencia o la mutación en el gen de la subunidad p35 de IL-12 y/o el gen de la subunidad p40 de IL-12 puede ser cualquier deficiencia o mutación que dé como resultado una falta de expresión de heterodímero p75 de IL-12. Por otra parte, puede usarse cualquier método convencional para obtener células mamíferas que tengan una mutación en el gen de la subunidad p35 de IL-12 y/o el gen de la subunidad p40 de IL-12 que dé como resultado fenotipo deficiente en p75 de IL-12.

De acuerdo con la presente invención, células mamíferas activadas que expresan anticuerpos para el heterodímero p75 de IL-12 humana pueden obtenerse inmunizando a un ratón u otro mamífero con IL-12 humana natural o IL-12 recombinante. La IL-12 humana natural y la IL-12 humana recombinante pueden prepararse mediante cualquier técnica convencional conocida en la especialidad, tales como las técnicas proporcionadas en los ejemplos aquí.

Líneas celulares de mieloma, es decir, los socios de fusión, adecuadas para el uso en la producción de los hibridomas que secretan los anticuerpos para IL-12 de la presente invención incluyen líneas celulares de mieloma bien conocidas en la especialidad, tales como, por ejemplo, líneas celulares SP 2/0 y NS/O. Se prefieren células de mieloma de ratón SP2/0. Preferiblemente, el socio de fusión de mieloma y la célula mamífera activada contra el heterodímero p75 de IL-12 se derivan de la misma especie.

Células de hibridoma que producen los anticuerpos de la presente invención pueden seleccionarse y aislarse mediante cualesquiera métodos convencionales conocidos en la técnica. Preferiblemente, células de mieloma y linfocitos activados contra el heterodímero p75 de IL-12 se cultivan juntos en medio que contiene un agente de selección capaz de destruir las células de mieloma pero no los linfocitos. Se forman hibridomas a partir de las células de mieloma que se fusionan con los linfocitos activados contra el heterodímero p75 de IL-12. Tales células de hibridoma son capaces de crecer en el medio que contiene el agente de selección debido a que el DNA de los linfocitos suministra a la línea celular de mieloma el gen necesario que codifica una enzima que evita los efectos tóxicos del agente de selección permitiendo una ruta metabólica alternativa para reemplazar la ruta metabólica bloqueada por el agente de selección. Cualesquiera linfocitos no fusionados mueren debido a que no están transformados y tienen tiempos de vida finitos cortos *in vitro*. De acuerdo con la presente invención un agente de selección adecuado para el uso en la selección de células de hibridoma es la aminopterina. Un medio preferido para cultivar las células de hibridoma es Medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) complementado con 10% de FBS (Hyclone), 100 unidades/ml de

ES 2 284 242 T3

penicilina G (BioWhittaker), 100 µg/ml de estreptomicina (BioWhittaker), 250 ng/ml de Fungizone (BioWhittaker), 2 mM de glutamina (BioWhittaker), 100 µg/ml de sulfato de gentamicina (BioWhittaker), 50 µM de 2-mercaptopropano (BioRad), 100 µM de hipoxantina (Sigma), 400 nM de aminopterina (Sigma), 16 µM de timidina (Sigma) y 2,5% de sobrenadante P388D1 (producido como se describe por Nordan, R.P. y otros, J. Immunol., 139:813 (1987)).

5 La potencia de los anticuerpos para IL-12 de la presente invención se determina con respecto a la concentración de anticuerpos para IL-12 a la que se produce 50% de inhibición máxima de bioactividad de IL-12 según se mide mediante ensayos de proliferación de linfoblastos humanos o producción de IFN-γ estimuladas por IL-12. Los anticuerpos anti-IL-12 humana de la presente invención exhiben una potencia superior que anticuerpos para IL-12 específicos de heterodímero caracterizados previamente. Además, los anticuerpos anti-humanos de la presente invención exhiben mayor eficacia, según se mide mediante la extensión de la inhibición máxima de la proliferación de linfocitos o la producción de IFN-γ estimuladas por IL-12, que anticuerpos para IL-12 específicos de heterodímero caracterizados previamente.

10 15 La potencia y la eficacia de los anticuerpos descritos aquí pueden determinarse mediante cualquier ensayo convencional conocido en la especialidad, tales como, por ejemplo, ensayos de proliferación de linfoblastos o ensayos de síntesis de IFN-γ inducidos por IL-12.

20 De acuerdo con la presente invención, cualquier método convencional conocido en la técnica puede usarse para determinar la inhibición de la proliferación de linfoblastos estimulada por IL-12 humana mediante los anticuerpos para IL-12. En general, los linfocitos humanos pueden activarse mediante un número de métodos, incluyendo el tratamiento con lectinas mitógenas, por ejemplo fitohemaglutinina A (PHA), u otros agentes activantes, solos o en combinación, tales como citoquinas, ésteres de fobol y ionóforos, anticuerpos dirigidos contra moléculas de la superficie celular o cualquier otro método que conduzca a la activación de los linfocitos. Los linfocitos activados se incuban a continuación 25 con y sin IL-12 en ausencia o presencia de los anticuerpos, y se mide la velocidad de proliferación de linfocitos determinando la velocidad de síntesis de DNA midiendo la incorporación de ³H-timidina en DNA, contando el número de células presente después de varios períodos de tratamiento o cualquier otro método que pueda usarse para verificar la velocidad de proliferación celular. La inhibición de la proliferación se determina comparando la proliferación de linfocitos a una concentración definida de IL-12 en ausencia y presencia de diversas concentraciones de anticuerpos 30 para IL-12.

35 En un ensayo de proliferación de linfocitos estándar, la inhibición de la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 humana se determina con respecto a los niveles de proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 humana sin anticuerpos añadidos y niveles de fondo de proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA, es decir, la proliferación en ausencia tanto de IL-12 como 40 de anticuerpos. En general, los niveles estimulados por IL-12 de proliferación dan aproximadamente 10.000-80.000 cpm en el presente ensayo de proliferación de linfocitos humanos estándar, dando los niveles de fondo de proliferación aproximadamente 5.000-20.000 cpm. Debido a la variabilidad inherente entre partidas de linfoblastos humanos activados por PHA estimulados, solo los ensayos en los que la relación de proliferación estimulada a proliferación de fondo (es decir, el índice de estimulación) era igual a o mayor que 3 se consideran válidos para la medida de la proliferación estimulada por IL-12.

45 De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier método convencional para determinar la inhibición de la producción de IFN-γ por los anticuerpos para IL-12. Por ejemplo, linfocitos humanos activados, preparados como se describe aquí, o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas activadas, preparadas tratando sangre entera o PBMC aisladas con agentes mitógenos incluyendo lectinas, citoquinas, ésteres de fobol, ionóforos 50 o anticuerpos dirigidos contra moléculas de la superficie celular, solos o en combinación, o mediante cualquier otro método que conduzca a la proliferación de PBMC humanas activadas, se incuban con o sin IL-12 y varios otros agentes, por ejemplo IL-2 y/o IL-1β, en ausencia y presencia de los anticuerpos. La producción de IFN-γ se determina a continuación, por ejemplo muestreando el medio de cultivo y determinando la concentración de IFN-γ mediante ELISA o cualquier otro método que pueda medir cuantitativamente IFN-γ. La inhibición de la producción de IFN-γ se determina comparando la producción de IFN-γ a una concentración definida de IL-12 en ausencia y presencia de diversas concentraciones de anticuerpos anti-IL-12.

55 60 En un ensayo de síntesis de IFN-γ estándar, la inhibición de IFN-γ se determina con respecto a la producción de IFN-γ estimulada por IL-12 y niveles de fondo de producción de IFN-γ, es decir, síntesis de IFN-γ en presencia o ausencia de IL-12. En general, los niveles estimulados por IL-12 de producción de IFN-γ son aproximadamente 7-220 ng/ml, dando los niveles de producción de fondo aproximadamente 1-3 ng/ml.

65 Los presentes anticuerpos neutralizan la bioactividad de IL-12 de mono Rhesus con una potencia similar a su potencia para inhibir la bioactividad de IL-12 humana, haciéndolos antagonistas de IL-12 útiles para estudios *in vivo* en el mono Rhesus. La potencia y la eficacia incrementada de estos anticuerpos anti-IL-12 humana y su reactividad cruzada con IL-12 de mono Rhesus los hacen candidatos excelentes para diseñar antagonistas de IL-12 eficaces para el uso en seres humanos.

En particular, la presente invención proporciona cuatro anticuerpos, 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11, para el heterodímero p75 de IL-12 humana. Las líneas celulares de hibridoma correspondientes que producen estos anticuerpos se han depositado el 11 de diciembre de 1997 bajo las condiciones del Tratado de Budapest en the American Type Culture

ES 2 284 242 T3

Collection bajo los números de registro del ATCC HB-12446, HB-12447, HB-12449 y HB-12448, respectivamente. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos cuatro anticuerpos. Cualesquiera anticuerpos que tengan las características que se reivindican son abarcados dentro de la presente invención.

5 La Fig. 6 proporciona la secuencia de nucleótidos que codifica una porción de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 16G2 específico para el heterodímero p75 y la secuencia de aminoácidos deducida de esta secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos que codifica una porción de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 20E11 específico para el heterodímero p75 y la secuencia de aminoácidos deducida de esta secuencia de nucleótidos se proporcionan en la Fig. 7. Se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse cambios de aminoácidos conservativos en las regiones constantes de los anticuerpos para IL-12 específicos para el heterodímero presentes sin afectar significativamente a la especificidad/afinidad de unión a antígenos. Puede esperarse que los anticuerpos para IL-12 específicos para el heterodímero que contienen cambios de aminoácidos en las regiones estructurales variables o más específicamente en las regiones que determinan la complementariedad tengan un mayor efecto sobre la especificidad/afinidad de unión a antígeno.

10 15 Los anticuerpos para IL-12 de la presente invención pueden ser anticuerpos completos que incluyen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Alternativamente, los anticuerpos para IL-12 pueden ser constructos tales como anticuerpos monocatenarios o “mini”-anticuerpos que retienen la actividad de unión a uno o más epítopos del heterodímero p75 de IL-12. Tales constructos pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, la clonación y el ensamblaje mediados por PCR de anticuerpos monocatenarios para la expresión en *E. coli* (según se describe en Antibody Engineering, The practical approach series, J. McCafferty, H.R. Hoogenboom y D. J. Chiswell, editores, Oxford University Press, 1996). En este tipo de constructo, las porciones variables de las cadenas pesada y ligera de una molécula de anticuerpo se amplifican por PCR a partir de cDNA. Los amplicones resultantes se ensamblan a continuación, por ejemplo en una segunda etapa de PCR, a través de un DNA conector que codifica un conector proteínico flexible compuesto por los aminoácidos GLY y SER. Este conector permite que las porciones de la cadena pesada y ligera variables se plieguen de tal modo que el bolsillo de unión a antígeno se regenere y el antígeno se una con afinidades a menudo comparables a la molécula de inmunoglobulina dímera de longitud completa parental.

20 25 30 35 Los anticuerpos anti-IL-12 humanos descritos aquí pueden humanizarse para formar anticuerpos que poseen afinidad igual o substancialmente similar para el heterodímero p75 de IL-12 que anticuerpos anti-IL-12 humanos mamíferos, pero son substancialmente no inmunogénicos en seres humanos. Por ejemplo, un anticuerpo para IL-12 humanizado de acuerdo con la presente invención puede incluir regiones estructurales de la cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales de anticuerpos humanizados son de aproximadamente 60% a 95% idénticas a las regiones estructurales donantes. Los anticuerpos humanizados pueden producirse mediante técnicas recombinantes bien conocidas en la especialidad. Métodos para producir inmunoglobulinas humanizadas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.530.101.

40 45 Los anticuerpos para IL-2 de la presente invención son antagonistas útiles para controlar enfermedades con patologías que están mediadas a través de mecanismos inmunitarios, particularmente enfermedades asociadas con una bioactividad de IL-2 incrementada que dan como resultado actividad de células cooperadoras tipo Th1 aberrante. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos para IL-12 se usan para tratar trastornos autoinmunes en seres humanos u otros mamíferos, tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus autoinmune y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Los anticuerpos descritos aquí también pueden usarse para tratar otros estados patológicos que se ha observado que se benefician de la administración de anticuerpos para IL-12, incluyendo, por ejemplo, enfermedad de trasplante/injerto contra el huésped y choque séptico.

50 55 Los intervalos de dosis para la administración de los anticuerpos para IL-12 presentes pueden determinarse por los expertos normales en la técnica sin experimentación excesiva. En general, dosificaciones apropiadas son aquellas que son suficientemente grandes para producir el efecto deseado, es decir, neutralizar al menos 90% de bioactividad de IL-12. Sin embargo, la dosificación no debe ser tan grande que provoque efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente, las contraindicaciones, si las hay, la tolerancia inmunitaria y otras variables tales, que han de ser ajustadas por el médico individual.

60 65 Los anticuerpos para IL-12 pueden administrarse parenteralmente mediante inyección o mediante perfusión gradual a lo largo del tiempo. Pueden administrarse intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles o acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer con lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Véase, generalmente, *Remington's Pharmaceutical Science*, 16^a Ed., Mack Eds., 1980.

ES 2 284 242 T3

Dosificaciones preferidas de los anticuerpos para IL-12 de la presente invención son de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de dos a tres veces a la semana. Sin embargo, la dosificación y el esquema de dosificación para la administración de los anticuerpos para IL-12 presentes pueden variar dependiendo del individuo que ha de tratarse, del anticuerpo administrado y de las variables analizadas anteriormente. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos para IL-12 pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticamente activos.

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Preparación de IL-12 Humana Natural

Se extrajo sangre de donantes voluntarios normales en jeringas que contenían heparina libre de conservante (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU. de A.) para dar una concentración final de -5 unidades de heparina/ml de sangre. Un volumen de sangre heparinizada se diluyó en 9 volúmenes de medio que consistía en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 y medio de Eagle modificado de Dulbecco, complementado con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 60 µg/ml de HCl de arginina, tampón de HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (todos disponibles de GIBCO BRL, Grand Island, NY, EE.UU. de A.), 2-mercaptoetanol 50 µM (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EE.UU. de A.) y 1 mg/ml de dextrosa (Fisher). Se añadió a esta mezcla interferón- γ humano, 20 U/ml, (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, EE.UU. de A.) y células de Pansorbin (*Staphylococcus aureus* formalinizadas, cepa Cowan, Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU. de A.) a una dilución final de 1/4000. (Antes del uso en los cultivos, las células de Pansorbin se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (GIBCO BRL) y se reconstituyeron hasta el mismo volumen que el suministrado por el fabricante). La suspensión de células resultantes se dividió en partes alícuotas en matraces de cultivo tisular de 162 cm² (Costar, Cambridge, MA, EE.UU. de A.), 80 ml/matrás, y los matraces se incubaron horizontalmente a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%/aire al 95% durante 24 horas. Los fluidos del sobrenadante de cultivo se recogieron a continuación mediante centrifugación y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,22 µm (Costar). Heterodímero de IL-12 más p40 de IL-12 se purificaron de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de inmunoaфинidad usando una columna de proteína G-Sepharose (PGS) 2-4A1, según se describe posteriormente para la purificación de IL-12 de Rhesus, excepto que el tampón de elución contenía 0,01% de gelatina (Sigma) para minimizar la pérdida de proteína debida a la adsorción no específica a las superficies. El eluato se dializó durante de 4 a 6 horas frente a 100-200 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, y a continuación durante la noche frente al mismo volumen de RPMI 1640 que contenía 100 µg/ml de gentamicina. Los eluatos dializados se esterilizaron mediante el paso a través de un filtro de 0,22 µm y a continuación se ensayaron mediante ELISA con respecto al contenido de heterodímero de IL-12 y p40 de IL-12 (Gately, M.K., Chizzonite, R. y Presky, D.H., Measurement of human and mouse interleukin 12, *Current Protocols in Immunology, vol. 1*. J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach y W. Strober, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995, pp. 6.16.1-6.16.15) y con respecto a la bioactividad de IL-12 (ibid.). Típicamente, la relación en peso de p40 de IL-12:heterodímero de IL-12, según se mide mediante ELISA, era aproximadamente 5:1.

Ejemplo 2

Producción de IL-12 Humana Recombinante

IL-12 humana recombinante se preparó, se caracterizó y se generó como se indica en la Patente de EE.UU. N° 5.536.657.

Ejemplo 3

Generación de IL-12 de Monos Rhesus

Las secuencias de cDNA para las subunidades p35 y p40 para IL-12 de mono Rhesus (F. Villinger y otros, *J. Immunol.*, 155: 3946-3954 (1995)) se sometieron a ingeniería para la expresión en células CHO-dhfr menos sobre dos plásmidos separados usando procedimientos estándar (Current protocols in molecular biology, F. Ausubel, ed., J. Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1993)). Se obtuvieron clones de una población de células no amplificada y su producción de IL-12 se verificó mediante un ELISA específico para IL-12. Un clon óptimamente productor se seleccionó y se adoptó al crecimiento en medio libre de suero de CHO (Sigma). Las células se hicieron crecer subsiguientemente en cultivos giratorios con propósitos de producción de proteínas. IL-12 de mono Rhesus se purificó de los sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad a anticuerpos. La columna de afinidad se produjo reticulando 10 mg de mAb 2-4A1 anti-p40 de IL-12 humana (Chizzonite y otros, *J. Immunol.*, 147:1548-1556 (1991)) a proteína G-Sepharose (Pharmacia Biotech) usando 10 mM de pimelimidato de dimetilo (Pierce, Rockford, IL, EE.UU. de A.) a una densidad de 1 mg de mAb/ml de gel (Stem y Podlaski, Tech. In Protein Chem. IV, Acad. Press, Nueva York, 353-360 (1993)). El sobrenadante de CHO libre de suero que contiene IL-12 de Rhesus se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se cargó directamente sobre la columna PGS 2-4A1 de 10 ml previamente equilibrada en PBS, pH 7,2. El caudal era 1 ml/min. La columna se lavó con 10 volúmenes de PBS y se eluyó con HCl de glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 3 M, pH 9. La columna de afinidad era capaz de unirse a -2 mg de IL-12 de Rhesus/pasada, incluyendo monómero p40 en exceso, según se determina mediante Bradford y SDS-

ES 2 284 242 T3

PAGE. Otros contaminantes estaban a niveles traza. Para concentrar y purificar adicionalmente la IL-12 de Rhesus, el eluato que contiene IL-12 se dializó frente a fosfato Na 20 mM, pH 7, y se cargó sobre una columna de S-Sepharose acondicionada con la misma solución tamponadora. El caudal era 1 ml/min. Toda la proteína se unía. La columna se lavaba con 10 volúmenes de tampón de fosfato y a continuación se eluía con tampón de fosfato que contenía NaCl 5 0,3 M. La fracción reunida eluida se ensayó con respecto a endotoxina usando el estuche LAL de Biowittaker y se encontró que era < 10 EU/mg de proteína. El análisis por transferencia Western usando el mAB 2-4A1 como reactivo de detección mostraba el heterodímero de IL-12 de Rhesus a ~80 kDa así como un exceso aparente de monómero p40 a 40 kDa. SDS-PAGE teñida con Coomassie muestra una proteína prominente adicional de igual intensidad al heterodímero p80 a ~70 kDa. Las proteínas tanto de 80 como de 70 kDa se reducen hasta sus forman monómeras 10 después del tratamiento con 2-mercaptopetanol, pero la última banda de proteína no reacciona con mAb 2-4A1.

Ejemplo 4

Preparación, Caracterización y Purificación de Anticuerpos de Híbridoma

Ratones que tienen una mutación en el gen de la subunidad p35 de IL-12 sobre el fondo de Balb/c se produjeron como se describe en Mattner, F. y otros, Eur. J. Immunol., 26:1553-1559 (1996). Los ratones deficientes en p35 de IL-12 se inmunizaron intraperitonealmente con 5 µg de IL-12 humana recombinante humana purificada en adyuvante completo de Freund. Los ratones recibían 3 inyecciones de refuerzo intraperitoneales subsiguientes de 5 µg de IL-12 15 humana en adyuvante incompleto de Freund durante un período de 2,5 meses. Las inyecciones finales de 75 µg de IL-12 humana en PBS (50 µg i.p. y 25 µg i.v.) se administraron tres y dos días antes de la esplenectomía, seguido por una inyección i.p. de 50 µg de IL-12 humana en PBS un día antes de la esplenectomía. Los esplenocitos se recogieron de estos ratones y se fusionaron a células SP2/0 de mieloma de ratón a una relación de 1:1 usando polietilenglicol 20 a 1500 (Boehringer Mannheim) al 50% p/v de acuerdo con el método de Oi y Herzenberg, en Selected Methods in Cellular Immunology, ed. B. Mishell y S. Shiigi, W. H. Freeman and Co., Nueva York, 1980, pp. 351-372. Las células 25 fusionadas se cultivaron en placa a una densidad de 60.000 células totales/pocillo en placas apilables de 96 pocillos en IMDM complementado con FBS (Hyclone) al 10%, 100 unidades/ml de penicilina G (BioWhittaker), 100 µg/ml de estreptomicina (BioWhittaker), 250 ng/ml de Fungizone (BioWhittaker), 2 mM de glutamina (BioWhittaker), 100 µg/ml de sulfato de gentamicina (BioWhittaker), 2-mercaptopetanol (BioRad) 50 µM, hipoxantina (Sigma) 100 µM, 30 aminopterina (Sigma) 400 nM, timidina (Sigma) 16 µM y 2,5% de sobrenadante P388D1 (producido como se describe por Nordan, R.P. y otros, J. Immunol., 139:813 (1987)). Los sobrenadantes de híbridoma se ensayaron con respecto a anticuerpos anti-IL-12 humana específicos mediante inmunoprecipitación de IL-12 marcada con ¹²⁵I según se describe 35 posteriormente. Las líneas celulares de híbridoma que secretan anticuerpos anti-IL-12 humana se clonaron mediante dilución limitativa. Los anticuerpos se purificaron de ascitis mediante tratamiento secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico según se describe previamente (Reik, L. y otros, J. Immunol. Methods, 100:123-130 (1987)).

Ejemplo 5

Preparación de IL-12 Humana Marcada con ¹²⁵I

IL-12 humana recombinante se radiomarcó hasta una actividad específica de aproximadamente 2200 Ci/mmol usando una modificación del procedimiento Iodogen (Pierce Chemical Co.) descrito previamente en Chizzonite y otros, J. Immunol., 147: 1548-1556 (1991) y Chizzonite y otros, J. Immunol., 148: 3117-3124 (1992), que se incorporan aquí mediante referencia. Iodogen se disolvió en cloroformo y 0,05 mg se secaron en un tubo de vidrio de borosilicato de 12 x 15 mm. Para el radiomarcaje, se añadió 1,0 mCi de Na[¹²⁵I] (Amersham, Chicago, Ill., EE.UU. de A.) a un tubo revestido con Iodogen que contenía 0,05 ml de Tris-tampón de yodación (25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,4 M de NaCl y 1 mM de EDTA) y se incubaron durante 6 min a temperatura ambiente. La solución de ¹²⁵I activada se transfirió a un tubo que contenía 0,1 ml de IL-12 (31,5 µg) en Tris-tampón de yodación y la reacción se incubó 40 durante 6 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, se añadieron 0,05 ml de tampón de parada Iodogen (10 mg/ml de tirosina, 10% de glicerol en PBS de Dulbecco, pH 7,4) y se hicieron reaccionar durante 5 minutos. La mezcla se diluyó a continuación con 1% (p/v) de BSA en 1,0 ml de Tris-tampón de yodación, y se aplicó a una 45 columna de desalado Bio-Gel P10DG (BioRad Laboratories (BRL)) para cromatografía. La columna se eluyó con 1% (p/v) de BSA en Tris-tampón de yodación y las fracciones (1 ml) que contenían las cantidades máximas de proteína marcada se combinaron y se diluyeron hasta 1 x 10⁸ cpm/ml con 1% (p/v) de BSA en Tris-tampón de yodación. La 50 radiactividad precipitable con TCA (10% de concentración final de TCA) estaba típicamente por encima de 95% de la radiactividad total. La actividad radioespecífica de la IL-12 humana recombinante era típicamente aproximadamente 2200 Ci/mmol.

Ejemplo 6

Ensayo de Inmunoprecipitación de IL-12 Humana Marcada con ¹²⁵I

Placas divisibles de 96 pocillos Nunc Maxisorp se revistieron con anticuerpo de conejo purificado por afinidad para IgG de ratón (Cappel, Durham, NC, EE.UU. de A.) incubando 18 h a 4°C con 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de anti-(IgG de ratón) de conejo en tampón de revestimiento de carbonato (Na₂CO₃ 15 mM/NaHCO₃ 35 mM), pH 9,6. Los pocillos revestidos se lavaron con PBS/Tween 20 al 0,05%/Thimersol al 0,01% y a continuación se bloquearon 65 mediante incubación con 200 µl de 1% (p/v) de BSA/PBS/0,01% de Thimersol durante 4 h a 37°C. Sobrenadantes de híbridoma (75 µl) se añadieron a los pocillos revestidos con anti-IgG de ratón y se incubaron durante 3 h a 22°C.

ES 2 284 242 T3

Los pocillos se lavaron tres veces con 300 μ l de PBS/Tween-20 al 0,05%/Thimerosol al 0,01% y a continuación 100.000 cpm de IL-12 humana marcada con 125 I se añadieron a cada pocillo con 100 μ l de tampón de dilución de anticuerpo (PBS/PSA al 1% (p/v)/NaCl 0,5 M/Tween-20 al 0,05%/Thimerosol al 0,01%).

Después de 18 h a 4°C, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS/Tween-20 al 0,05%/Thimerosol al 0,01%. Los pocillos se separaron a continuación y la cantidad de radiactividad unida a los pocillos se determinó usando un contador gamma. En algunos experimentos, después de la incubación de los sobrenadantes en hibridoma en los pocillos revestidos con anti-(IgG de ratón) de conejo, 100 μ l de sobrenadante acondicionado procedente de células COS transfectadas con p40 de IL-12 humana preparadas como se describe previamente (Gubler y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 4143-4147 (1991)) se incubaron en los pocillos durante 1 h a 37°C antes de la adición de IL-12 humana marcada con 125 I para determinar si los anticuerpos anti-IL-12 humana de ratón capturados se unían a la subunidad p40 de IL-12 humana.

Ejemplo 7

Identificación de Anticuerpos Anti-IL-12 Humana Monoclonales

Un ensayo de inmunoprecipitación basado en placas de 96 pocillos se usó para identificar hibridomas que secretan anticuerpos anti-IL-12 humana. Los sobrenadantes de hibridoma se incubaron en ausencia y presencia de 100 μ l de sobrenadante de células COS que contiene subunidad p40 de IL-12 humana según se describe anteriormente. Se añadió IL-12 humana marcada con 125 I (100.000 cpm/pocillo) y se determinó la cantidad de IL-12 humana marcada con 125 I capturada sobre los pocillos. La Fig. 1 muestra los anticuerpos contenidos en sobrenadantes procedentes de IL-12 humana marcada con 125 I capturada en los hibridomas 5F2, 16F2, 16G2, 20E11 y 17E2. Además, la presencia de la subunidad p40 de IL-12 humana no marcada durante la reacción de inmunoprecipitación no bloqueaba la captura de IL-12 humana marcada con 125 I por los anticuerpos 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11, demostrando que estos anticuerpos no tienen alta afinidad para la subunidad p40 de IL-12 sola. En contraste, la presencia de subunidad p40 de IL-12 humana no marcada durante la reacción de inmunoprecipitación bloqueaba completamente la captura de IL-12 humana marcada con 125 I por 17E2, demostrando que 17E2 reconocía la subunidad p40 de IL-12 humana.

Ejemplo 8

Enfoque Isoeléctrico Analítico de Anticuerpos Monoclonales Anti-IL-12 Humana

El enfoque isoeléctrico analítico se realizó usando una pH 3,5-9,5 Ampholine PAGplate de Pharmacia Biotech (Nº de código 80-1124-80, Uppsala, Suecia). El enfoque isoeléctrico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando soluciones de electrodo de ácido fosfórico 1 M e hidróxido sódico 1 N. El gel se cargó con 5 muestras, cada una de las cuales contenía una sola inmunoglobulina, es decir, 20E11, 5F2, 20C2, 16G2 y 16F2. Los patrones eran del Isoelectric Focusing pH 3-10 Calibration Kit de Pharmacia Biotech (Nº de código 17-0471-01). Las condiciones de avance eran 1000 voltios, 10 vatios, 2,5 horas, 4°C. El gel se tñó con plata usando el Pharmacia Biotech PlusOne Silver Staining Kit para proteína (Nº de código 17-1150-01) de acuerdo con las directrices del fabricante. La Fig. 2 muestra los patrones de enfoque isoeléctrico de anticuerpos monoclonales anti-IL-12 humana 20C2, 16G2, 16F2, 20E11 y 5F2.

Ejemplo 9

Patrones de Enfoque Isoeléctrico de los Anticuerpos Monoclonales Anti-IL-12 Humana

Según se muestra en la Fig. 2, los anticuerpos monoclonales 20C2 (Chizzonite y otros, Cytokine, 6: A82a (1994)), 20E11 y 5F2 son inmunoglobulinas únicas. Los anticuerpos monoclonales 16G2 y 16F2 parecen idénticos mediante enfoque isoeléctrico, pero ambos son diferentes de 20C2, 20E11 y 5F2. El pI de estos anticuerpos está en el intervalo de pH 5-6.

Ejemplo 10

Generación de Linfoblastos Activados por PHA

Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas activadas por PHA de 4 días para determinar la proliferación tanto inducida por IL-12 humana natural como inducida por IL-12 de mono de Rhesus. Las PBMC se aislaron (Gately y otros, J. Natl. Cancer Inst., 69:1245 (1982)) y se estimularon con 0,1% de PHA-P (Difco Labs., Detroit, MI, EE.UU. de A.). Después de 3 días, los cultivos se dividieron 1:1 con medio reciente y 50 U/ml de IL-2 humana recombinante según se describe (Gately, M.K., Chizzonite, R. y Presky, D.H., Measurement of human and mouse interleukin 12, *Current Protocols in Immunology, vol. 1.*, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach y W. Strober, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995, pp. 6.16.1-6.16.15). El medio complementado usado para el cultivo celular era como el descrito previamente para la producción de IL-12 humana natural con la adición de 5% de suero AB humano (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU. de A.).

ES 2 284 242 T3

Ejemplo 11

Ensayo de Proliferación de Linfocitos

5 Los efectos de los diversos anticuerpos monoclonales anti-IL-12 humana sobre la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12 e IL-2 se determinaron mediante un método basado en M. K. Gately y otros (Gately, M.K., Chizzonite, R. y Presky, D.H., Measurement of human and mouse interleukin 12, *Current Protocols in Immunology, vol. 1.* J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach y W. Strober, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1995, pp. 6.16.1-6.16.15). El día 4, linfoblastos activados por PHA, preparados como se describe anteriormente, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en medio complementado a 4 x 10⁵ células/ml y se incubaron en placas de 96 pocillos (2 x 10⁴ células/pocillo) con anticuerpo anti-IL-12 humana monoclonal purificado y la citoquina pertinente, es decir IL-12 humana o de mono. Partes alícuotas de 25 µl tanto de IL-12 humana natural a 1 ng/ml como de IL-12 de mono a 2 ng/ml se mezclaron con partes alícuotas de 25 µl de diversas diluciones de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-IL-12 humana. La concentración de anticuerpo final en 10 los pocillos variaba de 0,0005 µg/ml a 0,5 µg/ml. Un grupo idéntico separado de pocillos que contenían los diversos mAbs anti-IL-12 humana e IL-12 recombinante se preparó para determinar los efectos de los mAbs anti-IL-12 humana sobre la proliferación estimulada por IL-2 como una medida de la especificidad inhibidora. Una curva de respuesta a la dosis estándar que variaba de 250 pg o 500 pg por pocillo de IL-12 de ser humano o de mono, respectivamente, hasta 0 pg sin anticuerpos añadidos también se incluyó para determinar la sensibilidad a IL-12. Placas que contenían 15 mezclas de citoquinas y anticuerpos se incubaron durante 30 minutos a 37°C y a continuación partes alícuotas de 50 µl de suspensión de células se añadieron a los pocillos. Las placas del cultivo se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire durante 48 horas antes de someter a impulsos con ³H-timidina. Cincuenta µl de 20 10 µCi/ml de ³H-timidina (diluida en medio complementado con FCS al 5% en lugar de suero AB humano al 5%) se añadieron a cada pocillo. Después de la incubación durante 6 h adicionales a 37°C, los contenidos de los pocillos 25 se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio a través de un recogedor de células y la incorporación de ³H-timidina en DNA celular se medía mediante el uso de un contador de centelleo de líquidos. Los valores mostrados en las Figs. 3 y 4 son las medias de pocillos por triplicado.

Ejemplo 12

30 *Inhibición de la Proliferación de Linfoblastos Activados por PHA Estimulada por Citoquinas por Anticuerpos Anti-IL-12 Humana Monoclonales*

La proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada con 0,25 ng/ml de IL-12 se inhibió de 35 un modo dependiente de la dosis mediante los anticuerpos 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11 (Fig. 3). Las potencias de estos anticuerpos antihumanos, definida como la concentración que produce 50% de inhibición máxima (IC₅₀) de la proliferación estimulada por 0,25 ng/ml de IL-12, son 0,03 µ/ml para 5F2, 0,01 µg/ml para 16F2, 0,01 µg/ml para 16G2 y 0,01 µg/ml para 20E11. Los niveles máximo (9440 cpm) y de fondo (1480 cpm) de proliferación de linfoblastos se representan mediante las líneas punteadas horizontales en los extremos superior e inferior de las gráficas, respectivamente. 40 Según se muestra en la Fig. 3, los anticuerpos 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11 eran capaces de inhibir la proliferación de linfoblastos activados por PHA estimulada por IL-12 humana en al menos 90%. En contraste, como también se muestra en la Fig. 3, el anticuerpo específico para p75 anti-IL-12 humana previamente identificado, 20C2 (Chizzonite y otros, Cytokine, 6: A82a (1994)), no es capaz de inhibir substancialmente la bioactividad de IL-12 humana.

45 Además, según se muestra en la Fig. 4, 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11 inhibían potientemente la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada con 0,5 mg/ml de IL-12 de mono Rhesus, con una IC₅₀ similar a la observada con la proliferación estimulada por IL-12 humana. En contraste, 20C2 solo tiene un efecto inhibidor mínimo sobre la proliferación estimulada por IL-12 de mono Rhesus. Por lo tanto, los anticuerpos 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11 parecen exhibir buena reactividad cruzada con IL-12 de mono Rhesus, mientras que la reactividad cruzada 50 de 20C2 es mucho menor. Ninguno de estos anticuerpos monoclonales inhibía la proliferación inducida por IL-12, demostrando que su efecto sobre la proliferación estimulada por IL-12 era específico para IL-12 y no se debía a una inhibición general de la proliferación celular.

Ejemplo 13

55 *Ensayos de Síntesis de Interferón-γ*

Las síntesis de interferón-γ (IFN-γ) se indujo usando linfoblastos humanos activados por PHA de 4 días producidos como se describe anteriormente. El medio usado era una mezcla 1:1 de RPMI 1640 y medio de Eagle modificado 60 de Dulbecco como se describe anteriormente para la preparación de IL-12 humana natural que contiene, además, 5% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EE.UU. de A.) inactivado térmicamente (56°C, 30 min) al 5% en lugar de suero AB humano. Cultivos de 1 ml duplicados se establecieron en los pocillos de placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Costar). A cada pocillo se añadieron 5 x 10⁵ linfoblastos activados con PHA, 0,25 ng/ml de IL-12 humana natural purificada, 20 unidades/ml de IL-2 humana recombinante, 1 ng/ml de IL-1β humana recombinante 65 (proporcionada por el Dr. R. Chizzonite, Hoffmann-La Roche) y las concentraciones indicadas de anticuerpos anti-IL-12 humana. Inicialmente, todos los reactivos excepto los linfoblastos se añadían a los pocillos y se incubaban a 37°C durante 30 min, seguido por la adición de los linfoblastos. Los cultivos se incubaron a continuación durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire. Al final de este tiempo, los fluidos del sobrenadante de

ES 2 284 242 T3

cultivo se recogieron mediante centrifugación y se ensayaron con respecto a su contenido de IFN- γ mediante el uso de un ELISA. La cantidad de IFN- γ producida en cultivos que contenían linfoblastos con IL-2 + IL-1 pero no IL-12 era siempre menor que 15% y habitualmente menor que 5% de la producida en cultivos que contenían 0,25 ng/ml de IL-12 además de IL-2 + IL-1.

5 El ELISA para medir IFN- γ humano usaba anticuerpos anti-IFN- γ humano monoclonales de Endogen (Woburn, MA). Placas Nunc EIA (Fisher) se revistieron durante la noche a 4°C con 100 μ l/pocillo de 1 μ g/ml de anti-IFN- γ humano (Endogen Nº M-700A) en tampón de revestimiento (Na_2CO_3 0,015 M + NaHCO_3 0,035 M en agua destilada, pH 9,6). A la mañana siguiente, el tampón de revestimiento se succionó de los pocillos y los pocillos se bloquearon 10 mediante la adición de 200 μ l/pocillo de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS; Fisher) que contenía 1% de albúmina de suero bovino (Sigma). Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron con D-PBS que contenía 0,05% de Tween 20 (Sigma) y partes alícuotas de 100 μ l de patrón de IFN- γ humano recombinante (Endogen) o sobrenadantes de cultivo diluidos en tampón de ensayo (D-PBS + albúmina de suero bovino al 0,5% + Tween 20 al 0,05%) se añadieron a los pocillos. Las placas se incubaron a continuación 15 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Después de esto, las placas se lavaron de nuevo y cada pocillo recibía 100 μ l de 300 ng/ml de anti-IFN- γ humano biotinilado (Endogen Nº M-701-B) en tampón de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C, seguido por agitación. Partes alícuotas de 100 μ l de estreptavidina-peroxidasa (Sigma) diluidas 1:1000 en tampón de ensayo se añadieron a continuación a cada pocillo y las placas se incubaron durante 20 30 min a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo y a continuación se revelaron mediante la adición de partes alícuotas de 100 μ l de una mezcla 1:1 de TMB Peroxidase Substrate y Peroxidase B Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EE.UU. de A.). La reacción se detuvo después de -12 min mediante la adición de 50 μ l/pocillo de H_3PO_4 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm con substracción del fondo a 650 nm.

Ejemplo 14

25 *Inhibición de la Producción de Interferón- γ Estimulada por Citoquinas por Anticuerpos Anti-IL-12 Humana Monoclonales*

La producción de IFN- γ por linfoblastos humanos activados con PHA estimulada con 0,25 ng/ml de IL-12 humana 30 se inhibió de un modo dependiente de la dosis mediante los anticuerpos 5F2, 16F2, 16G2 y 20E11 (Fig. 5). Las potencias de estos anticuerpos antihumanos, definida como la concentración que produce 50% de inhibición máxima (IC_{50}) de la producción de IFN- γ estimulada por 0,25 ng/ml de IL-12 humana, son 0,02 μ g/ml para 5F2, 0,02 μ g/ml para 16F2, 0,01 μ g/ml para 16G2 y 0,02 μ g/ml para 20E11. Estos anticuerpos para IL-12 específicos de heterodímero 35 antihumanos eran capaces de inhibir más de 90% de la producción de IFN- γ estimulada por IL-12 cuando se usaban en 0,05 μ g/ml. En contraste, el anticuerpo específico de p75 de IL-12 antihumano 20C2 (Chizzonite y otros, Cytokine, 6: A82a (1994)) es menos potente y es incapaz de inhibir la producción de IFN- γ estimulada por IL-12 en más de 65% a concentraciones menores que o iguales a 0,5 μ g/ml.

Ejemplo 15

40 *Análisis de la Secuencia de los Genes que Codifican la Región Variable de las Cadena Pesadas de Anticuerpo Presentes en las Líneas Celulares de Híbridoma que Producen Anticuerpo Anti-IL-12 Humana*

Se extrajo RNA total de células de híbridoma usando el sistema de aislamiento de RNA Ultraspec siguiendo el 45 protocolo del fabricante (Biotecx, Houston, TX, EE.UU. de A.). Se sintetizó cDNA de primera hebra a partir de 10 μ g de RNA total y cebadores oligo-dT en un volumen de 20 μ l. Una parte alícuota de 4 μ l de la mezcla de reacción de cDNA se usó como plantilla para la amplificación por PCR de la región variable de la cadena pesada de IgG de ratón usando cebadores que se diseñaban de acuerdo con la información de secuencia de la estructura 1 y 4 según se 50 presenta por Dattamajumdar y otros (A.K. Dattamajumdar y otros, Immunogenetics 43:141-151 (1996)). Se realizó una reacción de PCR de 30 ciclos usando una temperatura de reasociación de 50°C. Toda la reacción de PCR se extrajo con fenol, se precipitó con etanol y se hizo recorrer un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% para aislar el amplicón. El fragmento de DNA se cortó del gel, se fundió a 70°C y 5 μ l se reamplificaron en una reacción de PCR de 30 ciclos para generar más material. El amplicón reamplificado se purificó en gel y se sometió a secuenciación 55 usando un método de secuenciación de Sanger basado en fluorescencia con un secuenciador automático de Applied Biosystems Incorporated.

Ejemplo 16

60 *Secuencias de Nucleótidos y de Aminoácidos Deducida de la Región Variable de las Cadena Pesadas de Anticuerpo Anti-IL-12 Humana Monoclonal*

Las secuencias de nucleótidos de una porción de la región variable del gen de la cadena pesada de inmunoglobulina que abarca la región estructural (FR) 1, la región que determina la complementariedad (CDR) 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de anticuerpos para IL-12 producidos por las líneas celulares de híbridoma HIL-12F3-16G2 y HIL-65 12F3-20E11 y sus secuencias de aminoácidos deducidas se muestran en la Fig. 6 y la Fig. 7, respectivamente. Las secuencias de las CDR están subrayadas. La comparación de la información de secuencias disponible mostraba que las cadenas pesadas de anticuerpos producidos por los híbridomas HIL-12F3-16G2 y HIL-12F3-20E11 exhiben 94% de homología a nivel de DNA y 93% de similitud a nivel de aminoácidos.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal para IL-12 humana que consiste en una subunidad p35 y una subunidad p40 que
5 forman un heterodímero p75, en donde dicho anticuerpo monoclonal
- (a) reacciona inmunológicamente con un epítopo presentado por el heterodímero p75 de IL-12 humana, pero
no es inmunológicamente reactivo con ningún epítopo presentado por dicha subunidad p40 sola; y
- 10 (b) neutraliza al menos aproximadamente 90% de la bioactividad de IL-12 humana según se mide
- (i) inhibiendo la proliferación de linfoblastos humanos activados por PHA estimulada por IL-12, en donde
la concentración de dicho anticuerpo es 0,5 µg/ml y la concentración de dicha IL-12 humana es 0,25
ng/ml; o
- 15 (ii) inhibiendo la producción de IFN-γ estimulada por IL-12, en donde la concentración del anticuerpo es
0,5 µg/ml y la concentración de dicha IL-12 humana es 0,25 ng/ml.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo reacciona cruzadamente con IL-12 de
20 mono Rhesus.
3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el anticuerpo se produce a partir
de una línea celular del ratón.
- 25 4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo
monoclonal.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo es producido
por un hibridoma, específicamente un hibridoma que tiene el número de denominación del ATCC HB-12446, HB-
30 12447, HB-12448 o HB-12449.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo está humanizado.
7. Un hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 35 8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las
reivindicaciones 1-6.
9. Un método para producir el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende
40 las etapas de:
- (a) inmunizar a un mamífero deficiente en un gen que codifica dicha subunidad p35 o dicha subunidad p40 con
el heterodímero p75 de IL-12 humana para producir anticuerpos;
- 45 (b) obtener anticuerpos del mamífero inmunizado;
- (c) rastrear dichos anticuerpos con respecto a su capacidad para unirse selectivamente a un epítopo presentado
por el heterodímero p75 para obtener dicho anticuerpo que se une selectivamente.
10. Un método para producir el anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6,
50 que comprende las etapas de:
- (a) inmunizar a un mamífero deficiente en un gen que codifica dicha subunidad p35 o dicha subunidad p40 con
el heterodímero p75 de IL-12 humana para producir anticuerpos;
- 55 (b) recoger células productoras de anticuerpo del mamífero inmunizado;
- (c) formar un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal a partir de dichas células y obtener dicho anti-
cuerpo monoclonal;
- 60 (d) rastrear dicho anticuerpo monoclonal producido por dicho hibridoma con respecto a la capacidad para
unirse selectivamente a un epítopo presentado por el heterodímero p75 para obtener anticuerpo monoclonal
que se une selectivamente.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los anticuerpos producidos a partir del hibridoma se
65 rastrean y seleccionan adicionalmente con respecto a su capacidad para reaccionar cruzadamente con IL-12 de mono
Rhesus.

ES 2 284 242 T3

12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, siempre que se haya producido por procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 o un procedimiento que comprende un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11.
- 5 13. Uso de cualquiera de los anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunes.
- 10 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el trastorno autoinmune es esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus autoinmune o enfermedad inflamatoria del intestino.
- 15 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.
16. Uso de cualquiera de los anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped o el choque séptico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE IL-12 HUMANA MARCADA CON ^{125}I

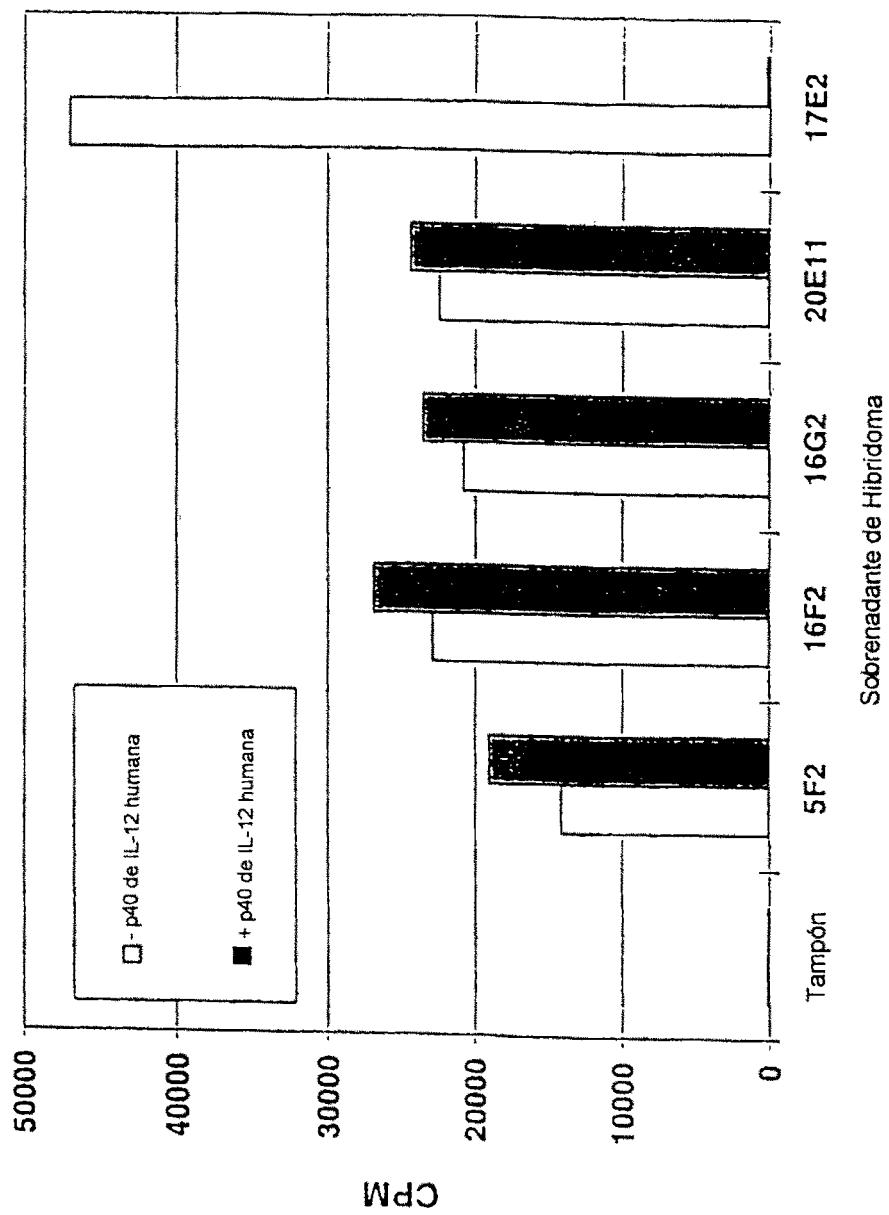


FIG. 1

Sobrenadante de Híbrido

ES 2 284 242 T3

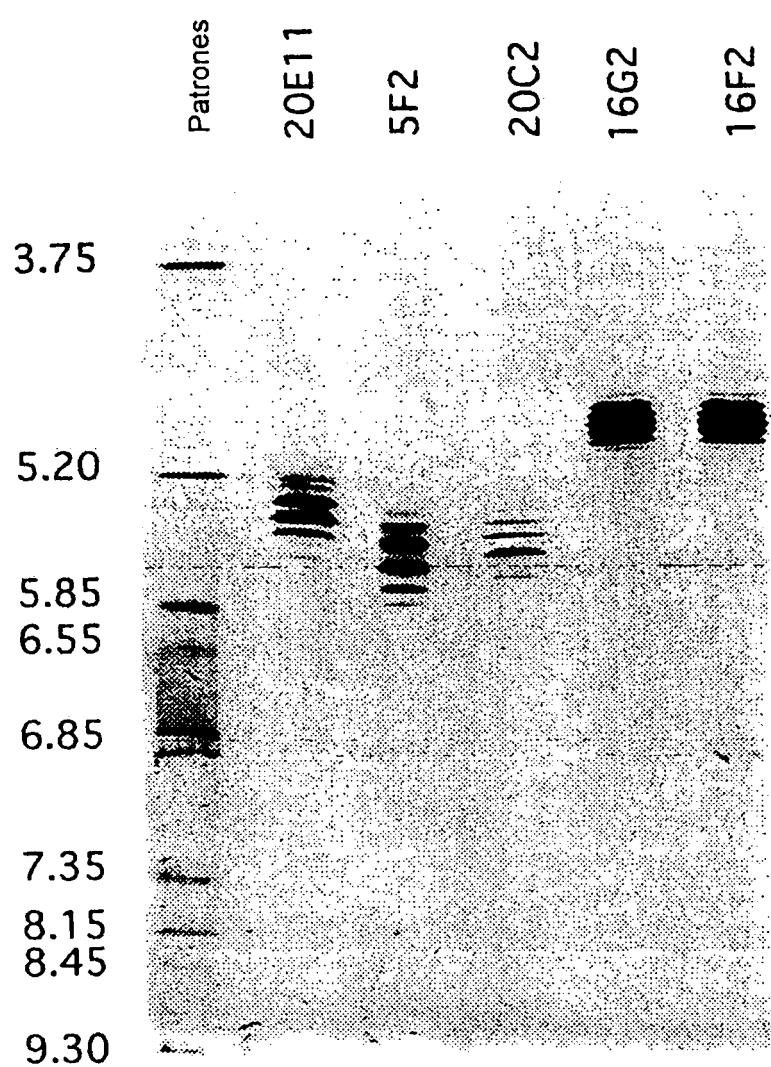


FIG. 2

Inhibición de la Proliferación de Blastos PHA Inducida por IL-12 Natural por mAbs Anti-IL-12

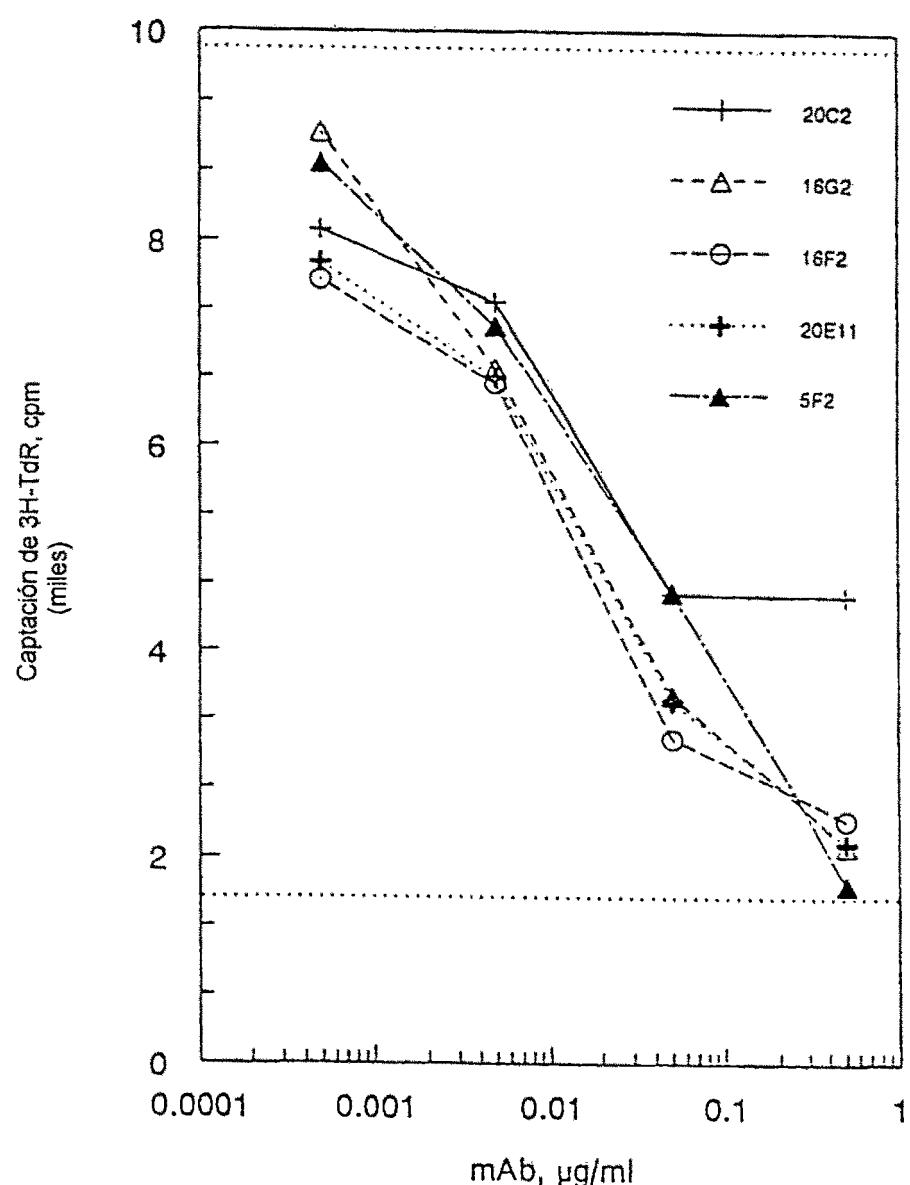


FIG. 3

Inhibición de la Proliferación de Blastos PHA
Inducida por IL-12 por mAbs Anti-IL-12

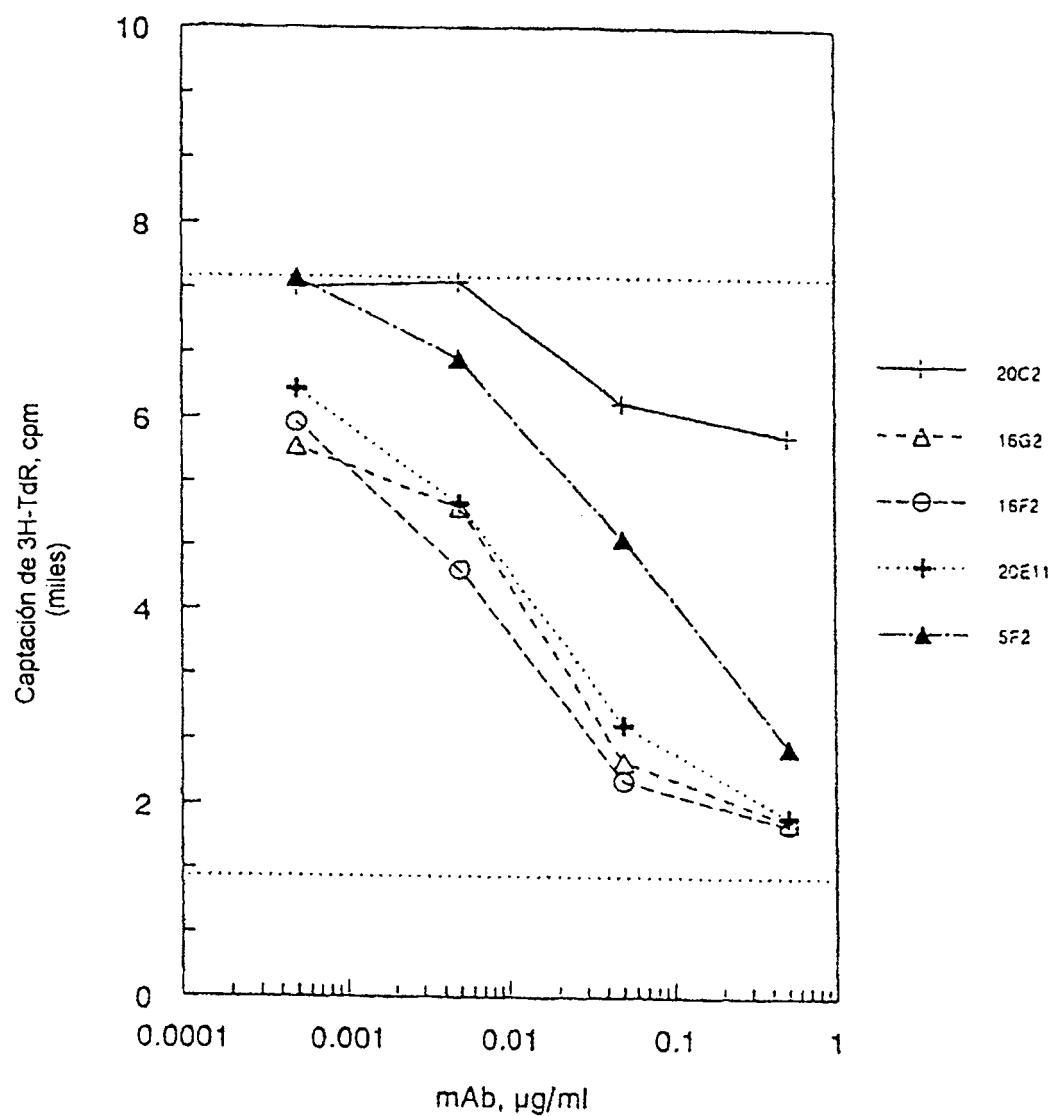
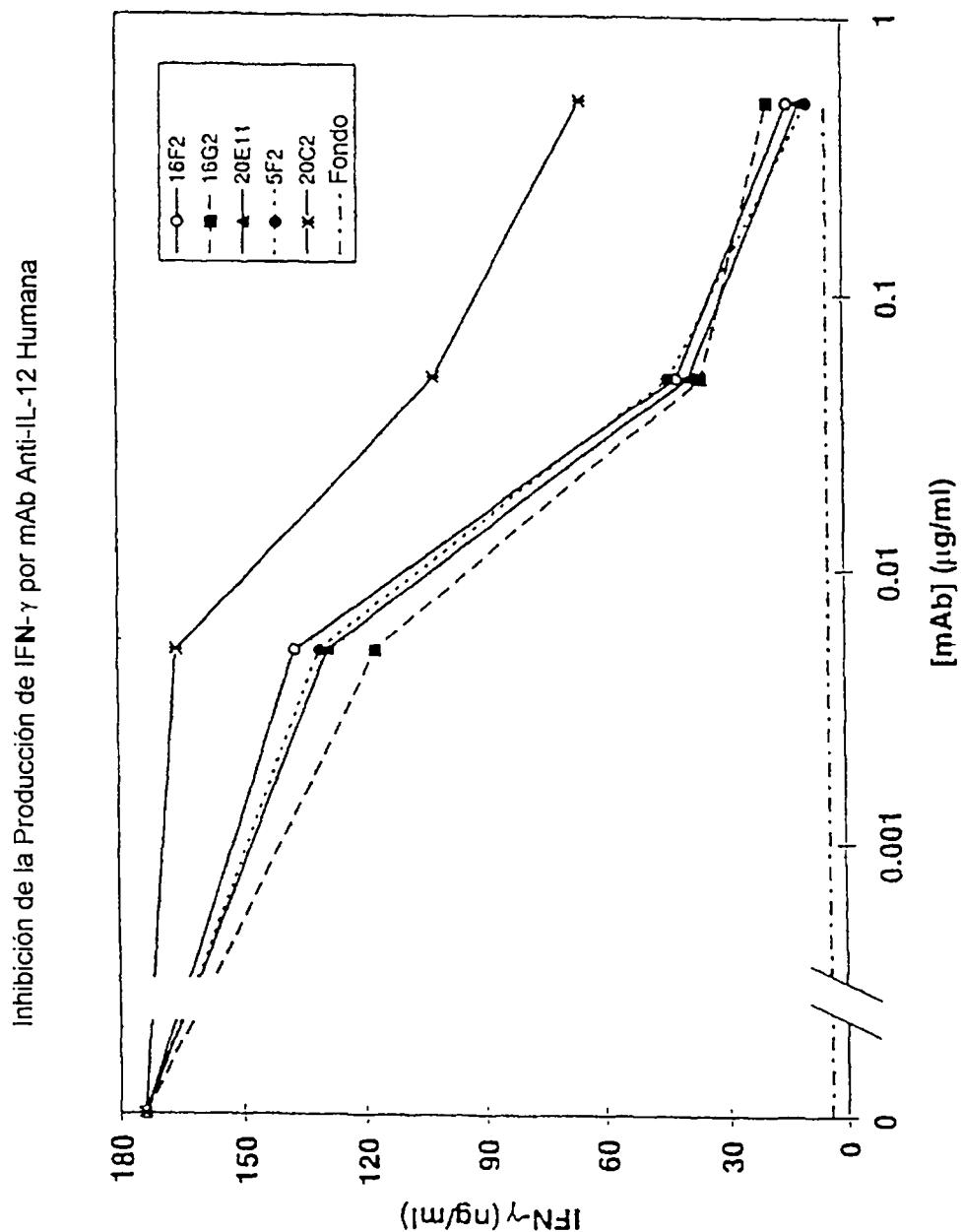


FIG. 4



ES 2 284 242 T3

Región Variable de Cadena Pesada de 16G2

27 54

CTG GAG GAG TCA GGA CCT AGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG ACT CTG TCC CTC ACC
 GAC CTC CTC AGT CCT GGA TCG GAG CAC TTT GGA AGA GTC TGA GAC AGG GAG TGG
 Leu Glu Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr

81 108

TGT TCT GTC ACT GGC GAC TCC ATC ACC AGT GGT TAC TGG AAC TGG ATC CGG AAA
 ACA AGA CAG TGA CCG CTG AGG TAG TGG TCA CCA ATG ACC TTG ACC TAG GCC TTT
 Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Glv Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys

243	270
AAC CAG TAC TAC CTG CAG TTG AGT TCT GTG ACT ACT GAG GAC TCA GCC ACR TAT	
TTG GTC ATG ATG GAC GTC AAC TCA AGA CAC TGA TGA CTC CTG AGT CGG TGT ATA	
Asn Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr	

297

TAC TGT GCA AGA TCT TCG GAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC GCA GGG ACC ACG
 ATG ACA CGT TCT AGA AGC CTA CGA AAC CTG ATG ACC CCG CGT CCC TGG TGC
 Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Ala Gly Thr Thr

FIG. 6.

ES 2 284 242 T3

Región Variable de Cadena Pesada de 20E11

81 108

TCT GTC ACT GGC GAC TCC ATC ACC AGT GGT TAC TGG AAC TGG ATC CGG AAA TTC
 AGA CAG TGA CCG CTG AGG TAG TGG TCA CCA ATG ACC TTG ACC TAG GCC TTT AAG
 Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Glv Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe

135 162

```
CCA GAT AAT ACA CTT GAG TAC ATG GGA TAC ATA AGT TAC AGT GGT AGT ACT TAC
GGT CTA TTA TGT GAA CTC ATG TAC CCT ATG TAT TCA ATG TCA CCA TCA TGA ATG
Pro Asp Asn Thr Leu Glu Tyr MET Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
```

297

FIG. 7

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: F. Hoffmann-La Roche AG
 - (B) CALLE: Grenzacherstrasse 124
 - 10 (C) CIUDAD: Basilea
 - (D) ESTADO: BS
 - (E) PAÍS: Suecia
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4002
 - 15 (H) TELEFAX: 061-6881395
 - (I) TELEX: 962292/965542 hlr ch
- 20 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS CONTRA IL-12 HUMANA
- 25 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) FORMA LEIBLE POR COMPUTADORA:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patent In Release Nº 1.0, Versión Nº 1.25 (EE.UU. de A.)

30 (2) INFORMACIÓN PARA EL Nº ID SEC: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 321 pares de bases
 - 35 (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE HEBRA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (ix) RASGO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - 45 (B) POSICIÓN: 1..321
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Nº ID SEC: 1:

50

55

60

65

ES 2 284 242 T3

	CTG GAG GAG TCA GGA CCT AGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG ACT CTG TCC	48
	Leu Glu Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser	
5	1 5 10 15	
	CTC ACC TGT TCT GTC ACT GGC GAC TCC ATC ACC AGT GGT TAC TGG AAC	96
	Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn	
10	20 25 30	
	TGG ATC CGG AAA TTC CCA GGG AAT AAA TTT GAG TAC ATG GGA TTC ATA	144
	Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Phe Glu Tyr Met Gly Phe Ile	
15	35 40 45	
	AGT TAT AGT GGT AGC ACT TAC AAT AAT CCA TCT CTC AAA AAT CGA GTC	192
	Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Val	
20	50 55 60	
	TCC ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAT AAC CAG TAC TAC CTG CAG TTG AGT	240
	Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Asn Asn Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Ser	
25	65 70 75 80	
	TCT GTG ACT ACT GAG GAC TCA GCC ACA TAT TAC TGT GCA AGA TCT TCG	288
	Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser	
30	85 90 95	
	GAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC GCA GGG ACC ACG	321
	Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Ala Gly Thr Thr	
35	100 105	

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC: 2:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 2:

55

60

65

ES 2 284 242 T3

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

5 Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
20 25 30

10 Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Phe Glu Tyr Met Gly Phe Ile
35 40 45

15 Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Val
50 55 60

20 Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Asn Asn Gln Tyr Tyr Leu Gln Leu Ser
65 70 75 80

25 Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser
85 90 95

30 Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105

(2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC: 3:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 308 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: doble
40 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (ix) RASGO:
(A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) POSICIÓN: 1..306
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 3:

50

55

60

65

ES 2 284 242 T3

	GAG GAG TCA GGA CCT AGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG ACT CTG TCC CTC	48
	Glu Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu	
5	1 5 10 15	
	ACC TGT TCT GTC ACT GGC GAC TCC ATC ACC AGT GGT TAC TGG AAC TGG	96
	Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn Trp	
10	20 25 30	
	ATC CGG AAA TTC CCA GAT AAT ACA CTT GAG TAC ATG GGA TAC ATA AGT	144
	Ile Arg Lys Phe Pro Asp Asn Thr Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Ser	
15	35 40 45	
	TAC AGT GGT AGT ACT TAC TAC AAT CCA TCT CTC AGA AGT CGA ATC TCC	192
	Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Ile Ser	
20	50 55 60	
	ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAG AAC CAG TAC TCC ATG CAG TTG AAT TCT	240
	Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Met Gln Leu Asn Ser	
25	65 70 75 80	
	GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA AGA TCC TCG GAT	288
	Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Asp	
30	85 90 95	
	GCT ATG GAC TAC TGG GGC GC	308
35	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
	100	

40 (2) INFORMACIÓN PARA EL N° ID SEC: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 102 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 4:

55

60

65

ES 2 284 242 T3

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

5 Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn Trp
20 25 30

10 Ile Arg Lys Phe Pro Asp Asn Thr Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Ser
35 40 45

15 Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Ile Ser
50 55 60

20 Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Met Gln Leu Asn Ser
65 70 75 80

25 Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Asp
85 90 95

30 Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100

35

40

45

50

55

60

65