

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 271**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 39/44** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02796411 .3**
96 Fecha de presentación: **23.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1425389**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **ANTICUERPOS HUMANOS ESPECÍFICOS PARA INTERLEUQUINA 15 (IL-15).**

30 Prioridad:
23.08.2001 US 314731 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
GENMAB A/S
BREDGADE 34 P.O. BOX 9068
1260 COPENHAGEN K, DK

72 Inventor/es:
VAN DE WINKEL, Jan, G., J.;
VAN DIJK, Marcus, Antonius;
SCHUURMAN, Janine;
GERRITSEN, Arnout, F. y
BAADSGAARD, Ole

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 375 271 T3

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 humanos específicos para interleuquina 15 (IL-15)

5 **Antecedentes de la Invención**

La interleuquina 15 (IL-15) es una citoquina proinflamatoria, una glicoproteína de 14-15 kD. Se ha informado de la expresión constitutiva en diversas células y tejidos incluyendo monocitos y macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células dendríticas (Waldmann y Tagaya, 1999; Fehniger y Caligiuri, 2001). La expresión está regulada al alza en condiciones inflamatorias, como se ha informado para monocitos estimulados con IFN- γ y LPS o mediante infección con virus, bacterias o protozoos (Kirman *et al.*, 1998; Waldmann *et al.*, 1998; Waldmann y Tagaya, 1999; Fehniger y Caligiuri, 2001). Además, en las enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide, es probable que la IL-15 producida localmente amplifique la inflamación por el reclutamiento y la activación de las células T sinoviales. Se ha sugerido que este efecto inducido por IL-15 juega un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Kirman *et al.*, 1998; McInnes *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1997; McInnes y Liew, 1998; Fehniger y Caligiuri, 2001).

Los estudios *in vitro* han demostrado que IL-15 comparte varias actividades biológicas con IL-2, debido a los componentes receptores compartidos. El receptor de IL-15 presente en las células T consiste en una única cadena α , IL-15R α , pero comparte la cadena β y la cadena γ con IL-2R. Como consecuencia, ambos receptores utilizan los mismos elementos de señalización Jak/STAT. Sin embargo, basándose en la regulación compleja y la expresión diferencial de IL-2 e IL-15 y sus receptores, se ha informado sobre diferencias críticas en las funciones *in vivo* (Kirman *et al.*, 1998; Waldmann y Tagaya, 1999; Waldmann *et al.*, 2001). También es importante observar el papel no redundante para el desarrollo, la supervivencia, la expansión y la función de IL-15 en células asesinas naturales (NK), células T NK y linfocitos intraepiteliales (Kennedy *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000).

McInnes y colaboradores (McInnes *et al.*, 1997; McInnes y Liew, 1998) informaron de la inducción de la producción de TNF- α después de la estimulación por IL-15 en células T derivadas de pacientes con artritis reumatoide. Además, se demostró que las células T de sangre periférica activadas por IL-15 inducen una producción de TNF- α significativa por los macrófagos a través de un mecanismo dependiente del contacto celular. Debido al papel destructivo del TNF- α en la artritis reumatoide, la inhibición de esta citoquina disminuye la actividad de la enfermedad (Bathon *et al.*, 2000; Klippel, 2000; Lovell *et al.*, 2000; Maini y Taylor, 2000).

En el documento US 5.795.966 se describen antagonistas de IL-15 de mamífero incluyendo muteínas de IL-15, anticuerpos monoclonales contra IL-15 y productos conjugados con IL-15 que reducen la capacidad de IL-15 para estimular la proliferación de linfocitos T en un análisis CTLL *in vitro*.

Compendio de la Invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado que:

- (a) se une a IL-15 humana;
- (b) inhibe los efectos pro-inflamatorios inducidos por IL-15; y
- (c) comprende una región variable de una cadena pesada humana que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de la cadena ligera humana que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, donde:

(i) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 100-107 del SEQ ID NO: 2; la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 90-97 del SEQ ID NO: 4;

(ii) la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 50-66 del SEQ ID NO: 2 y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 51-57 del SEQ ID NO: 4; y

(iii) la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 31-35 del SEQ ID NO: 2 y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 24-35 del SEQ ID NO: 4.

La presente invención se basa en la generación y el aislamiento, por primera vez, de anticuerpos monoclonales completamente humanos descritos más arriba que se unen específicamente a IL-15 humana y que inhiben los efectos pro-inflamatorios inducidos por IL-15, así como la caracterización de tales anticuerpos novedosos y la demostración de su valor terapéutico en el tratamiento de una variedad de enfermedades mediadas por IL-15. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, se ha demostrado que los anticuerpos humanos inhiben tanto la producción de TNF α como la proliferación de células T, ambas las cuales están implicadas íntegramente en los trastornos inflamatorios. Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la presente invención proporcionan un método mejorado para tratar y prevenir tales trastornos (y cualquier otro trastorno mediado por IL-15), atribuibles en parte a su especificidad única (p. ej., especificidad de epítipo y especie), afinidad, estructura, actividad funcional y el

hecho de que son completamente humanos, haciéndolos significativamente menos inmunogénicos y más eficaces y útiles terapéuticamente cuando se administran a pacientes humanos que otros anticuerpos para IL-15 generados anteriormente (p. ej., anticuerpos murinos y humanizados). La presente invención también proporciona aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, la psoriasis, el rechazo de transplantes y los cánceres, para los anticuerpos que inhiben IL-15 de la invención.

Los anticuerpos humanos aislados de la invención incluyen una variedad de isotipos de anticuerpos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, e IgE. Típicamente, incluyen los isotipos IgG1 (p. ej., IgG1k), IgG3 e IgM. Los anticuerpos pueden ser completos (p. ej., un anticuerpo IgG1 o IgG3) o pueden incluir solamente una porción de unión al antígeno (p. ej., un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, o Fv de cadena sencilla).

En una realización, los anticuerpos humanos son anticuerpos recombinantes. En una realización concreta, el anticuerpo humano está codificado por ácidos nucleicos de una cadena pesada IgG humana y una cadena ligera kappa humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en el SEQ ID NO: 1 y el SEQ ID NO: 3, respectivamente, y las modificaciones de las secuencias conservativas de las mismas. En otra realización, el anticuerpo humano incluye regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera kappa que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en el SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, y las modificaciones de la secuencia conservativa de las mismas.

Los anticuerpos humanos de la invención se pueden producir recombinantemente en una célula anfitriona, tal como un transfectoma (p. ej., un transfectoma que consiste en células CHO inmortalizadas o células linfocíticas) que contienen ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, o ser obtenidos directamente de un hibridoma que expresa el anticuerpo (p. ej., que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de una cadena pesada humana y un transgén de una cadena ligera humana que codifican el anticuerpo, fusionados a una célula inmortalizada). En una realización concreta, los anticuerpos son producidos por un hibridoma referido en la presente memoria como 146B7 o por un transfectoma de una célula anfitriona (p. ej., una célula CHO) que contiene los ácidos nucleicos de la cadena pesada humana y la cadena ligera humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en los SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente, y las modificaciones conservativas de las mismas. También se describen en la presente memoria anticuerpos que son producidos por hibridomas referidos en la presente memoria como 146B7, 146H5, 404E4, y 404A8. En una realización preferida, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo localizado en el dominio que interacciona con la cadena β y/o γ de IL-15.

Los anticuerpos humanos de la presente invención se unen específicamente a IL-15 humana e inhiben la capacidad de IL-15 para inducir efectos pro-inflamatorios, p. ej., inhiben la producción de TNFα y/o inhiben la proliferación de células T, tales como PBMC o células T CTLL-2, después de la unión de IL-15 al receptor de IL-15. Típicamente, los anticuerpos humanos se unen a IL-15 con una constante de disociación en el equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10⁻⁷ M, tal como menos de aproximadamente 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M o 10⁻¹⁰ M o incluso menos cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIACORE 3000 utilizando IL-15 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando. En una realización concreta, el anticuerpo se une a IL-15 humana con una constante de disociación en el equilibrio (K_D) de aproximadamente 6,5 x 10⁻⁸ M.

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de unión al antígeno, de la invención. Por consiguiente, los vectores de expresión recombinantes que incluyen los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de la invención, y las células anfitrionas transfectadas con tales vectores, también están incluidos en la invención, como los métodos de elaboración de los anticuerpos de la invención mediante el cultivo de estas células anfitrionas.

La invención también hace referencia a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica regiones variables pesadas y ligeras de los anticuerpos de la invención, donde dichas regiones comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en el SEQ ID NO: 2 y en el SEQ ID NO: 4, respectivamente, y las modificaciones conservativas de las mismas. Tales vectores de expresión son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los mismos incluyen los vectores de transcripción/traducción *in vitro* que utilizan, por ejemplo, productos lisados de reticulocitos.

Asimismo se describen en la presente memoria células B aisladas de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que son capaces de expresar diferentes isotipos (p. ej., IgG, IgA y/o IgM) de anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a IL-15. Preferiblemente, las células B aisladas se obtienen a partir de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15. Preferiblemente, el animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana. Las células B aisladas son inmortalizadas después para proporcionar una fuente (p. ej., un hibridoma) de anticuerpos monoclonales humanos para IL-15.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos de la invención que se unen específicamente a IL-15. En una realización, el hibridoma incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, *p. ej.*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y transgén de la cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada. El animal no humano transgénico puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15 para generar hibridomas productores de anticuerpo. Los hibridomas concretos proporcionados por la invención incluyen 146B7, 146H5, 404E4, y 404A8.

En otro aspecto, la invención proporciona un animal no humano transgénico, tal como un ratón transgénico, que expresa anticuerpos monoclonales humanos de la invención que se unen específicamente a IL-15. En una realización concreta, el animal no humano transgénico es un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana. El animal no humano transgénico puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15. Preferiblemente, el animal no humano transgénico, *p. ej.*, el ratón transgénico, es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para IL-15 (*p. ej.*, IgG, IgA y/o IgM) experimentando una recombinación V-D-J y un cambio de isotipo. El cambio de isotipo se puede producir, *p. ej.*, mediante un cambio de isotipo clásico o no clásico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales humanos de la invención que reaccionan específicamente con IL-15. En una realización, el método incluye inmunizar un animal no humano transgénico, *p. ej.*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15. Después se obtienen células B (*p. ej.*, células B esplénicas) del animal y se fusionan con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra IL-15.

En otro aspecto, la presente invención ofrece un anticuerpo anti-IL-15 humano de la invención conjugado con un radical terapéutico, *p. ej.*, un fármaco citotóxico, una toxina enzimáticamente activa, o uno de sus fragmentos, un radioisótopo, o un fármaco anti-canceroso de molécula pequeña.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones, *p. ej.*, composiciones farmacéuticas y de diagnóstico, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo monoclonal humano de la invención que se une específicamente a IL-15. La composición puede incluir adicionalmente otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes inmunosupresores, o agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos in-vitro para inhibir los efectos pro-inflamatorios de IL-15, tales como la inhibición de la producción de TNF- α y/o la proliferación de las células T inducidas por IL-15, preferiblemente sin inhibición de la actividad (*p. ej.*, producción de TNF α y/o proliferación de células T) de proteínas/citoquinas estructuralmente relacionadas (*p. ej.*, IL-2) utilizando uno o más anticuerpos humanos de la invención.

Los anticuerpos humanos de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades mediadas por IL-15 administrando los anticuerpos a pacientes que padecen tales enfermedades.

Las enfermedades ilustrativas que se pueden tratar (*p. ej.*, mejorar) o prevenir utilizando los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, trastornos inflamatorios, tales como artritis (*p. ej.*, artritis psoriásica y artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil activas), enfermedad inflamatoria intestinal. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos reducen la paraqueratosis, reducen el grosor epidérmico y reducen la proliferación de los queratinocitos en la psoriasis. También se ha demostrado que los anticuerpos reducen la inflamación y/o evitan la quimiotaxis de los leucocitos activados implicados en la artritis reumatoide. Los anticuerpos también se pueden utilizar para tratar enfermedades infecciosas, tales como la infección por VIH. Además, se pueden utilizar anticuerpos para tratar el rechazo de trasplantes. Adicionalmente, se pueden utilizar los anticuerpos para tratar una variedad de enfermedades que implican neovascularización mediada por IL-15, tales como el crecimiento de tumores y cánceres, *p. ej.* la leucemia de células T.

Los anticuerpos humanos de la presente invención también se pueden combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes anti-inflamatorios, FARMES (fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, agentes quimioterapéuticos, y agentes para la psoriasis.

En una realización, el sujeto se puede tratar adicionalmente con uno o más agentes que intensifican la inhibición del efecto pro-inflamatorio de los anticuerpos, *p. ej.*, un agente anti-inflamatorio, tal como un fármaco esteroideo o un AINES (fármaco anti-inflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), AINE tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindaco (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro), e

indometacina (Indocin).

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser para la administración combinada con uno o más FARME, tales como metotrexato (Rheumatrex), hidroxiclороquina (Plaquenil), sulfasalazina (Asulfidine), inhibidores de la síntesis de pirimidina, *p. ej.* leflunomida (Arava), agentes bloqueadores del receptor de IL-1, *p. ej.* anakinra (Kineret), y agentes bloqueadores del TNF- α , *p. ej.* etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) y adalimumab.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser para la administración combinada con uno o más agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina (Sandimmune, Neoral) y azatioprina (Imural).

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser para la administración combinada con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como doxorubicina (Adriamicina), cisplatino (Platinol), bleomicina (Blenoxane), carmustina (Gliadel), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar), y clorambucil (Leukeran). Los anticuerpos humanos de acuerdo con la invención también pueden ser para la administración junto con terapia de radiación.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser para la administración combinada con uno o más agentes para tratar la psoriasis, tales como medicamentos tópicos que contienen alquitrán de hulla, vitamina A, cortisona u otros corticoesteroides, medicamentos orales o inyectados, tales como corticoesteroides, metotrexato, retinoides, *p. ej.* acicretina (Neogitason) o ciclosporina (Sandimmune, Neoral). Otros tratamientos pueden incluir la exposición a la luz solar o la fototerapia.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser para la administración combinada con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos de CD4 y anticuerpos específicos de IL-2. Se considera particularmente útil una combinación de los presentes anticuerpos humanos con anticuerpos específicos de CD4 o anticuerpos específicos de IL-2 para el tratamiento de enfermedades y los rechazos de transplantes.

También se describe en la presente memoria un método para detectar la presencia *in vitro* o *in vivo* del antígeno IL-15 en una muestra, *p. ej.*, para diagnosticar enfermedades mediadas por IL-15. En una realización de la invención, esto se logra poniendo en contacto una muestra que se va a someter a ensayo, junto con una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano de la invención, o una porción de unión al antígeno del mismo en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo e IL-15. Después se detecta la formación del complejo (*p. ej.*, utilizando un ELISA) en ambas muestras, y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia del antígeno IL-15 en la muestra de ensayo.

Otros rasgos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

40 Breve Descripción de los Dibujos

La *Figura 1* incluye gráficos que muestran la unión de los anticuerpos específicos de IL-15 humana, 146B7, 147H5, 404A8 y 404E4, a IL-15 humana (hIL-15) y a las proteínas de IL-15 mutantes, Q108S y D8SQ108S. Se examinaron las diluciones seriadas de los anticuerpos para determinar su unión a hIL-15 o a las proteínas de IL-15 mutantes D8SQ108S y Q108S en un ELISA.

Las *Figuras 2 y 3* muestran las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 y 4) y de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 y 3) de las regiones V_H y V_L, respectivamente, del anticuerpo 146B7. Se indican las regiones marco (FR) y determinantes de la complementariedad (CDR).

Las *Figuras 4A-D* incluyen gráficos que muestran la inhibición de la liberación de TNF- α mediada por IL-15 por el anticuerpo 146B7. Se incubaron PBMC humanas con hIL-15 (0, 50, 100 ng/ml) combinadas con anticuerpo 146B7 o con un anticuerpo de control de isotipo (0,1, 1, 10 μ g/ml) durante 72 horas. La cantidad de TNF- α producido se midió por medio de ELISA. Se muestran los datos de dos voluntarios sanos.

La *Figura 5* es un gráfico que muestra el efecto del anticuerpo 146B7 sobre la producción de TNF- α mediada por IL-2 o IL-15. Se incubaron PBMC humanas con hIL-15 (0, 50, 100 ng/ml) o con hIL-2 (100 ng/ml) combinadas con 146B7 (0,1, 1, 10 μ g/ml) durante 72 horas. La cantidad de TNF- α producido se midió por medio de ELISA.

La *Figura 6* es un gráfico que muestra la actividad inhibidora de los anticuerpos 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8 sobre la proliferación de CTLL-2 inducida por hIL-15. Las células CTLL-2 privadas de hIL-2 se incubaron con hIL-15 (60 pg/ml) combinada con diluciones seriadas de 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8 durante 48 horas. Se midió la incorporación de Timidina-³H para expresar la proliferación (cpm). Los resultados se presentan como los valores medios.

Las *Figuras 7-9* incluyen gráficos que muestran la actividad inhibidora de los anticuerpos 146B7 (*Figura 7*), 404E4

(Figura 8) y 404A8 (Figura 9) sobre la proliferación de PBMC inducida por IL-15. Las PBMC humanas fueron incubadas con hIL-15 (0, 25, 100 ng/ml; Figuras 7A, 8A, y 9A, respectivamente) o hIL-2 (0, 10, 100 ng/ml; Figuras 7B, 8B, y 9B, respectivamente) combinadas con 146B7 (Figura 7), 404E4 (Figura 8) o 404A8 (Figura 9) a 0,1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 72 horas. Se midió la incorporación de Timidina-[3H] para expresar la proliferación (cpm).

La *Figura 10* es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo 146B7 a monocitos estimulados con IFN γ . Se cultivaron PBMC humanas en presencia de IFN γ (500 U/ml) hasta durante 2 días (37°C). Se determinó la intensidad de la fluorescencia de al menos 5000 células por muestra después del análisis mediante citometría de flujo y acotamiento de los monocitos. Los datos muestran el índice de estimulación (I.E. = (tinción positiva con fluorescencia media)/(tinción de fondo con fluorescencia media)).

La *Figura 11* muestra la unión de los monocitos humanos con el anticuerpo 146B7 (panel B) o con el anticuerpo de control del isotipo (panel A). Se aislaron las PBMC humanas y se elaboraron preparaciones de Cytospin después de cultivar las células con IFN γ (500 U/ml). Las células se contratiñeron con hematoxilina.

La *Figura 12* muestra la unión de piel psoriásica humana con 146B7 (panel B) o con el anticuerpo de control del isotipo (hIgG1) (panel A). Se obtuvieron placas psoriásicas humanas de pacientes después del consentimiento informado, y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Los tejidos se tiñeron con anticuerpos biotinilados y se visualizaron después de la activación de peroxidasa de rábano picante.

La *Figura 13A* es un gráfico que muestra el porcentaje de células nucleadas en tejido de artritis reumatoide después del tratamiento de ratones SCID con 146B7 o con vehículo. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y se analizaron con Photo Shop versión 6.0. Los datos se muestran como la media y el e.t.m. de los núcleos (como el porcentaje del área total) de los ratones después del tratamiento con 146B7 (n=4) o tratamiento con vehículo (n=2). La *Figura 13B* muestra una tinción con H y E representativa de tejido de AR xenoinjertado en ratones SCID, después del tratamiento con 146B7 (panel B) o con PBS (panel A).

La *Figura 14* incluye gráficos que muestran los efectos del tratamiento con el anticuerpo 146B7 en ratones SCID/psoriasis. Las biopsias se fijaron en formalina para embeberlas en parafina y se tiñeron en H y E y para el antígeno nuclear Ki-67. La *Figura 14A* muestra la gravedad de la psoriasis evaluada por el grosor epidérmico que se midió desde el estrato córneo hasta el principio de las crestas epidérmicas. La *Figura 14B* muestra el grosor epidérmico que se midió desde el estrato córneo hasta la parte más profunda de las crestas epidérmicas. La *Figura 14C* muestra el grado de paraqueratosis. La *Figura 14D* muestra el número de células mononucleares inflamatorias en la dermis superior. La *Figura 14E* muestra el número de queratinocitos en ciclo Ki-67+.

La *Figura 15* muestra la tinción con H y E de piel psoriásica humana injertada en ratones SCID, después del tratamiento con anticuerpo 146B7 (panel C), con CsA (panel B), o con vehículo (panel A). Tres semanas después del trasplante los ratones recibieron PBS (placebo), CsA (ciclosporina A) (Sandoz) a una dosis de 10 mg/kg un día si y otro no durante 15 días, o 146B7 a una dosis de 20 mg/kg el día 1 y 10 mg/kg los días 8 y 15. Una semana después de la última inyección, los ratones se sacrificaron, y se tomó una biopsia con sacabocados de 4 mm de cada injerto. Las biopsias se fijaron en formalina para embeberlas en parafina y se tiñeron en H y E.

La *Figura 16* muestra la tinción con Ki-67 de piel psoriásica humana injertada en ratones SCID, después del tratamiento con 146B7 (panel C), con CsA (panel B), o con vehículo (panel A). Tres semanas después del trasplante los ratones recibieron PBS (placebo), CsA (ciclosporina A) (Sandoz) a una dosis de 10 mg/kg un día si y otro no durante 15 días, o 146B7 a una dosis de 20 mg/kg el día 1 y 10 mg/kg los días 8 y 15. Una semana después de la última inyección, los ratones se sacrificaron, y se tomó una biopsia por sacabocado de 4 mm de cada xenoinjerto. Las biopsias se fijaron en formalina para embeberlas en parafina y se tiñeron para el antígeno nuclear Ki-67.

La *Figura 17* es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo 146B7 a IL-15 unida al receptor. Se recubrieron placas con IL-15R α y se incubaron con IL-15. Después de 10 minutos, se añadió 146B7 biotinilado a los pocillos. Se evaluó la unión de 146B7 a IL-15 unida al receptor a 405 nm en un lector ELISA.

La *Figura 18* es un gráfico que muestra la unión del anticuerpo 146B7 a IL-15, después de la unión de IL-15 a su receptor expresado sobre células Raji. Después de la incubación de las células Raji que expresaban IL-15R con IL-15, se añadió 146B7 biotinilado a las células después de 10 minutos. La unión de 146B7 a IL-15 unida al receptor se evaluó mediante análisis FACS.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona agentes terapéuticos basados en anticuerpos novedosos para el tratamiento y diagnóstico de los trastornos mediados por IL-15 (es decir, trastornos causados por los efectos pro-inflamatorio de IL-15). Según se utiliza en la presente memoria, el término "efectos pro-inflamatorios de IL-15" incluye cualquier respuesta inmunitaria mediada por células o humoral inducida por IL-15, tales como la producción de TNF α y otros mediadores inflamatorios, y el reclutamiento/proliferación de células T. Las terapias de la invención emplean

anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en IL-15.

En una realización, los anticuerpos humanos se producen en un animal transgénico no humano, *p. ej.*, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para IL-15 (*p. ej.*, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo. Por consiguiente, varios aspectos de la invención incluyen anticuerpos y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como animales transgénicos no humanos, células B, transfectomas de células anfitrionas, e hibridomas para elaborar tales anticuerpos monoclonales. Los métodos de utilización de los anticuerpos de la invención para detectar células a las cuales está unida IL-15 y/o para inhibir las funciones mediadas por IL-15 ya sea *in vitro* o *in vivo*, también se describen en la presente memoria. Los métodos para dirigir los agentes a las células a las cuales está unida IL-15 también se describen en la presente memoria.

Con el fin de que la presente invención pueda ser más fácilmente comprendida, se definen primero ciertos términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "IL-15," "antígeno IL-15 " e "Interleuquina 15" se utilizan indistintamente en la presente memoria, e incluyen cualquiera de las variantes o isoformas que son expresadas naturalmente por las células.

El término "anticuerpo" referido en la presente memoria incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (esto es, "porción de unión al antígeno") o una cadena sencilla de los mismos. Un "anticuerpo" hace referencia a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden estar subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del anfitrión, incluyendo diferentes células del sistema inmunitario (*p. ej.*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (*p. ej.*, IL-15). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de los fragmentos de unión incluidos en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un brazo sencillito de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por un conector sintético que permite que sean elaborados como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse *p. ej.*, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla también estén incluidos en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, y los fragmentos se escrutan para determinar su utilidad de la misma manera ya que son anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un anticuerpo que presenta una especificidad de unión y una afinidad únicas para un epítipo concreto. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" hace referencia a un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única y que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, *p. ej.*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", según se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante métodos recombinantes, tales

- como (a) anticuerpos aislados de un animal (*p. ej.*, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos (descritos adicionalmente en la Sección I, más abajo), (b) anticuerpos aislados de una célula anfitriona transformada para expresar el anticuerpo, *p. ej.*, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro método que implique empalmar secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal humana de anticuerpos *in vivo*.
- Según se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define con relación al organismo no humano transgénico productor de dicho anticuerpo. Este término hace referencia a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico, y generalmente a partir de especies distintas de la del animal no humano transgénico.
- Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*p. ej.*, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-15 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de IL-15). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de IL-15 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras citoquinas relacionadas o con otras proteínas de IL-15 de diferentes especies. No obstante, el anticuerpo preferiblemente siempre se une a IL-15 humana. Además, un anticuerpo aislado está típicamente sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. En una realización de la invención, se combinan una serie de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades para IL-15 en una composición bien definida.
- Según se utiliza en la presente memoria, "unión específica" hace referencia a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^7 M, tal como aproximadamente menos de 10^8 M, 10^9 M o 10^{10} M o incluso inferior cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIACORE 3000 utilizando IL-15 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (*p. ej.*, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno íntimamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan indistintamente en la presente memoria con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".
- Se pretende que el término " K_D ", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.
- Según se utiliza en la presente memoria, "isotipo" hace referencia a la clase de anticuerpo (*p. ej.*, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada.
- Según se utiliza en la presente memoria, "cambio de isotipo" hace referencia al fenómeno por medio del cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a otras clases de Ig.
- Según se utiliza en la presente memoria, "isotipo no cambiado" hace referencia a la clase isotípica de la cadena pesada que es producida cuando no ha tenido lugar un cambio de isotipo; el gen CH que codifica el isotipo no cambiado es típicamente el primer gen CH inmediatamente aguas abajo del gen VDJ reordenado funcionalmente. El cambio de isotipo ha sido clasificado como cambio de isotipo clásico o no clásico. El cambio de isotipo clásico se produce mediante eventos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. El cambio de isotipo no clásico se puede producir, por ejemplo, por medio de recombinación homóloga entre σ_μ humano y Σ_μ humano (deleción asociada con δ). Se pueden producir mecanismos de cambio no clásicos alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otras, y efectuar el cambio de isotipo.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia de cambio" hace referencia a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación del cambio. Una secuencia "donadora del cambio", típicamente una región de cambio μ , estará 5' (esto es, aguas arriba) de la región constructo que se vaya a suprimir durante la recombinación de cambio. La región "aceptora del cambio" estará entre la región del constructo que se vaya a suprimir y la región constante de reposición (*p. ej.*, γ , ϵ , etc.). Como no existe un sitio específico en el que siempre se produce la recombinación, la secuencia génica final no será típicamente pronosticable a partir del constructo.

Según se utiliza en la presente memoria, "patrón de glicosilación" se define como el patrón de unidades carbohidratadas que están ancladas covalentemente a una proteína, más específicamente a una proteína inmunoglobulina. Un patrón de glicosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse por ser sustancialmente similar a los patrones de glicosilación que existen naturalmente en anticuerpos producidos por las especies de animales transgénicos no humanos, cuando un experto en la técnica reconozca el patrón de glicosilación del anticuerpo heterólogo por ser más similar a dicho patrón de glicosilación en la especie del animal transgénico no humano que al de la especie de la cual derivan los genes CH del transgén.

El término "de origen natural" según se utiliza en la presente memoria aplicado a un objeto hace referencia al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislada de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

El término "reordenado" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una configuración de un locus de la inmunoglobulina de la cadena pesada o la cadena ligera en el que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio V_H o V_L completo, respectivamente. Un locus de un gen de inmunoglobulina reordenado puede ser identificado mediante comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

El término "no reordenado" o "configuración de la línea germinal" según se utiliza en la presente memoria en referencia a un segmento V hace referencia a la configuración en la que el segmento V no es recombinado para que esté inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico", según se utiliza en la presente memoria, incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, pero preferiblemente es ADN de doble hebra.

Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico aislada", según se utiliza en la presente memoria en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (*p. ej.*, V_H , V_L , CDR3) que se unen a IL-15, haga referencia a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o la porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de IL-15, cuyas otras moléculas pueden flanquear naturalmente el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Los SEQ ID NO: 1-4 corresponden a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que comprenden las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y la cadena ligera (V_L) del anticuerpo anti-IL-15 humano 146B7 de la invención. En particular, los SEQ ID NO: 1 y 2 corresponden a la V_H del anticuerpo 146B7, los SEQ ID NO: 3 y 4 corresponden a la V_L del anticuerpo 146B7.

La presente invención también incluye "modificaciones de secuencias conservativas" de las secuencias mostradas en los SEQ ID NO: 1-4, esto es, modificaciones de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en los SEQ ID NO: 1-4 mediante mecanismos convencionales conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido es remplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*p. ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*p. ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*p. ej.*, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*p. ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (*p. ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*p. ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, un residuo de aminoácido no esencial pronosticado en un anticuerpo anti-IL-15 humano es remplazado preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-IL-15, tales como mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-IL-15 modificados resultantes se pueden escrutar para determinar la actividad de unión.

Por consiguiente, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótidos (región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera) descritas en la presente memoria y/o que contienen las secuencias de aminoácidos (región variable de la cadena pesada y ligera) descritas en la presente memoria (esto es, los SEQ ID NO: 1-4) incluyen anticuerpos sustancialmente similares codificados por o que contienen secuencias similares que han sido modificadas conservativamente. Más abajo se proporciona una discusión adicional en cuanto a cómo tales anticuerpos sustancialmente similares pueden ser generados basándose en las secuencias parciales (esto es, regiones variables de la cadena pesada y ligera) descritas en la presente memoria como los SEQ ID NO: 1-4.

5 Para los ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando están alineados óptimamente y se comparan, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos alrededor de 80% de los nucleótidos, normalmente al menos alrededor de 90% a 95%, y más preferiblemente al menos alrededor de 98% a 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibridan en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra.

10 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, % homología = núm. de posiciones idénticas/núm. total de posiciones x 100), tomando en consideración el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden completar utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes más abajo.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa GAP en el paquete de soporte lógico GCG (asequible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso del espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que ha sido incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos por peso PAM120, una penalización de la longitud del espacio de 12 y una penalización del espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que ha sido incorporado al programa GAP del paquete de soporte lógico GCG (asequible en <http://www.gcg.com>), utilizando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso del espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

20 Las secuencias de ácidos nucleicos y proteína de la presente invención se pueden utilizar como "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a las bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra =12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con espacios con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como describen Altschul et al., (1997) en Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

30 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un producto lisado celular, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o se vuelve "sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante mecanismos convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

35 Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, si bien están a menudo en una secuencia nativa (excepto para los sitios de restricción modificados y similares), de cualquier ADNc, genómico o sus mezclas pueden ser mutadas, de acuerdo con las técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de secuencias V, D, J, constantes nativas, cambios y otras de tales secuencias descritas en la presente memoria (donde "derivadas" indica que una secuencia es idéntica o modificada a partir de otra secuencia).

40 Un ácido nucleico está "conectado operablemente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o intensificador está conectado operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, conectado operablemente significa que las secuencias de ADN que están conectadas son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el marco de lectura. Para las secuencias de cambio, conectado operablemente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de cambio.

45 Se pretende que el término "vector", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha conectado. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un bucle de ADN de doble hebra circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el

genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la cual son introducidos (*p. ej.*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (*p. ej.*, vectores de mamífero no episómicos) pueden ser integrados en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo ser replicados junto con el genoma del anfitrión. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están conectados operativamente. Tales vectores son referidos en la presente memoria como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. No obstante, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (*p. ej.*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que se pretende que tales términos hagan referencia no solamente a la célula sujeto concreta sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias medioambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar a un sujeto con una enfermedad inflamatoria, tal como artritis, *p. ej.*, artritis reumatoide. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *p. ej.*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

En las siguientes subsecciones se describen diferentes aspectos de la invención con mayor detalle.

I. Producción de Anticuerpos Humanos para IL-15

Se pueden producir anticuerpos monoclonales humanos de la invención utilizando una variedad de técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de células somáticas convencional descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, *p. ej.*, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B, la técnica de presentación en fagos utilizando genotecas de genes de anticuerpos humanos.

El sistema animal preferido para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratón es bien conocida en la técnica, incluyendo los protocolos de inmunización y las técnicas para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.

En una realización, se generan anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-15 utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. En una realización, la invención emplea ratones transgénicos, referidos en la presente memoria como "ratones HuMAb" que contienen miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y de la cadena ligera κ no reordenadas humanas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas μ y κ endógenas (Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; revisado por Lonberg, N. (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) en *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) en *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en la Sección II más abajo y por Taylor, L. et al. (1992) en *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) en *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) en *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) en *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) en *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) en *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) en *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) en *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) en *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) en *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay, y GenPharm International; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807 de Surani et al.; las Publicaciones Internacionales Núms. WO 98/24884, publicada el 11 de Junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de Noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de Junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de Diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de Marzo de 1992. La preparación de ratones HuMAb transgénicos HCO12, en particular, se describe en el Ejemplo 2.

Inmunizaciones

5 Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para IL-15, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (*p. ej.*, ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación purificada o enriquecida del antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15, como describen, por ejemplo, Lonberg et al. (1994) en Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) en Nature Biotechnology 14: 845-851 y en el documento WO 98/24884. Como alternativa, se pueden inmunizar ratones con ADN que codifica IL-15 humana. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad después de la primera infusión. Por ejemplo, se puede utilizar una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) del antígeno IL-15 para inmunizar los ratones HuMAb intraperitonealmente. En el caso de que las inmunizaciones utilizando una preparación purificada o enriquecida del antígeno IL-15 no den como resultado anticuerpos, también se pueden inmunizar los ratones con células que expresan IL-15, *p. ej.*, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

15 La experiencia acumulativa con diferentes antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando son inmunizados inicialmente intraperitonealmente (IP) o subcutáneamente (SC) con antígeno en coadyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP/SC una semana sí y otra no (hasta un total de 10) con antígeno en coadyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria se puede controlar en el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante sangrías retroorbitales. El plasma puede ser escrutado mediante ELISA (como se describe más abajo), y se pueden utilizar los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IL-15 para las fusiones. Los ratones pueden ser reforzados intravenosamente con antígeno 3 días antes del sacrificio y la retirada del bazo.

Generación de Hibridomas Productores de Anticuerpos Monoclonales Humanos para IL-15

25 Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos para IL-15, se pueden aislar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden escrutar después para determinar la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50% (p/v). Las células se pueden cultivar en placa a aproximadamente 1×10^5 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene además de los reactivos habituales Fetal Clone Serum al 10%, 5-10% de Origen Hybridoma Cloning Factor (IGEN) y 1X HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio en el que HAT es reemplazado por HT. Después se pueden escrutar pocillos individuales mediante ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-IL-15 humana. Una vez que se produce un crecimiento del hibridoma importante, se puede observar el medio normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se puede volver a cultivar en placa, escrutar de nuevo, y si todavía es positivo para IgG humana, se pueden subclonar anticuerpos monoclonales anti-IL-15 al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar después *in vitro* para generar anticuerpos en el medio de cultivo tisular para su caracterización.

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos para IL-15

45 Los anticuerpos humanos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de células anfitrionas utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien sabido en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

50 Por ejemplo, en una realización, los genes de interés, *p. ej.*, genes de anticuerpos humanos, se pueden ligar en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariótico como los utilizados por el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados se puede introducir en células anfitrionas eucarióticas tales como células CHO o células NSO o alternativamente otras células eucarióticas como células derivadas de plantas, hongos o células de levaduras. Los métodos utilizados para introducir estos genes podrían ser los métodos descritos en la técnica tales como la electroporación, la lipofectina, la lipofectamina u otros. Después de introducir estos genes de anticuerpos en las células anfitrionas, las células que expresan el anticuerpo pueden ser identificadas y seleccionadas. Estas células representan los transfectomas que pueden ser amplificados después para determinar su nivel de expresión y aumentarlo a escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes se pueden aislar y purificar a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

60 Como alternativa estos genes de anticuerpos clonados se pueden expresar en otros sistemas de expresión tales como *E. coli* o en organismos completos o se pueden expresar sintéticamente.

Uso de Secuencias de Anticuerpos Parciales para Expresar Anticuerpos Intactos

65 Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácido que

están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias de fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR a partir del anticuerpo de origen natural específico injertado sobre secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, *p. ej.*, Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321:522-525; y Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). Tales secuencias marco pueden ser obtenidas de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias génicas de los anticuerpos maduros debido a que no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante unión V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en la uniformidad individual a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción amino terminal de la región marco. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción amino terminal de la región marco 1 y en la porción carboxi terminal de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo concreto con el fin de recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento PCT/US99/05535 presentado el 12 de Marzo de 1999). La secuencia de la cadena pesada y ligera parcial que abarca las regiones CDR es típicamente suficiente para este fin. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de la línea germinal contribuían a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se utiliza después para rellenar las porciones perdidas de las regiones variables. Las secuencias líder de la cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias que faltan, se pueden combinar secuencias de ADN clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Como alternativa, se puede sintetizar la región variable completa como un conjunto de oligonucleótidos solapantes, cortos y combinarlos mediante amplificación por PCR para crear un clon de la región variable completamente sintético. Este procedimiento tiene ciertas ventajas tales como la eliminación o la inclusión de sitios de restricción concretos, o la optimización de codones concretos.

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de la cadena pesada y la ligera de un hibridoma se utilizan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de la cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: las hileras de bases nucleotídicas repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266L19867019870); y, se diseñan sitios HindIII aguas arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Para las regiones variables tanto de la cadena pesada como ligera, las secuencias de las hebras codificantes optimizadas, y las correspondientes no codificantes se rompen en 30 - 50 nucleótidos, aproximadamente el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. De este modo, para cada cadena, se pueden ensamblar los oligonucleótidos en conjuntos de doble hebra solapantes que abarcan segmentos de 150 - 400 nucleótidos. Después se utilizan las reservas como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 - 400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de la región variable se romperá en dos reservas que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan después mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de la cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio BbsI de la cadena ligera kappa, o el sitio AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden ser clonados fácilmente en los constructos del vector de expresión.

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan después con las secuencias del promotor, la secuencia líder, el inicio de la traducción, la secuencia líder, la región constante, 3' no traducida, poliadenilación, y terminación de la transcripción clonadas para formar constructos del vector de expresión. Los constructos de expresión de la cadena pesada y ligera se pueden combinar en un único vector, transfectarlos simultáneamente, transfectarlos seriadamente, o transfectarlos por separado en células anfitrionas que después se fusionan para formar una célula anfitriona que expresa ambas cadenas.

Los plásmidos para su uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana se describen más abajo (Ejemplo 1). Los plásmidos fueron construidos de manera que las secuencias de ADNc de la cadena pesada V y ligera kappa V amplificadas por PCR pudieran ser utilizadas para reconstruir los minigenes de las cadenas pesada y ligera completos. Estos plásmidos se pueden utilizar para expresar anticuerpos IgG₁K o IgG₄K completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos y quiméricos de la presente invención también incluyen los anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM, e IgD. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Los rasgos estructurales de un anticuerpo anti-IL-15 humano descrito en la presente memoria, 146B7, 147H5, 404A8 y 404EA, se pueden utilizar para crear anticuerpos anti-IL-15 humanos relacionados estructuralmente que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a IL-15. Más específicamente, se pueden combinar una o más regiones CDR de 146B7, 147H5, 404A8 y 404E4 recombinantemente con regiones marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-IL-15 humanos diseñados recombinantemente, adicionales.

En otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-IL-15 que comprende:

preparar un anticuerpo de la invención que comprende (1) regiones marco de la cadena pesada humana y CDR de la cadena pesada humana, donde al menos una de las CDR de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDR mostradas en la Figura 2 (o los correspondientes residuos de aminoácido del SEQ ID NO: 2); y (2) regiones marco de la cadena ligera humana y CDR de la cadena ligera humana, donde al menos una de las CDR de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácido de las CDR mostradas en la Figura 3 (o los correspondientes residuos de aminoácido del SEQ ID NO: 4);
donde el anticuerpo conserva la capacidad para unirse a IL-15.

La capacidad del anticuerpo para unirse a IL-15 se puede determinar utilizando análisis de unión convencionales, tales como los mostrados en los Ejemplos (p. ej., un ELISA).

Los anticuerpos recombinantes de la invención preparados como se expone más arriba comprenden las CDR3 de la cadena pesada y ligera de 146B7, las CDR2 de 146B7 y las CDR1 de 146B7.

Además de por la simple unión a IL-15, se pueden seleccionar anticuerpos diseñados tales como los descritos más arriba por su conservación de otras propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como:

- (1) unión a IL-15 humana e inhibición de los efectos pro-inflamatorios inducidos por IL-15;
- (2) inhibición de la producción de TNF α o la proliferación de células T inducidas por IL-15;
- (3) unión a IL-15 humana con una constante de disociación en el equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIACORE 3000 utilizando IL-15 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando;
- (4) unión a un epítipo localizado en el dominio de interacción a la cadena β y/o γ de la IL-15 humana;
- (5) interferencia con la unión de Asp⁸ de la IL-15 humana a la unidad β del receptor de IL-15 humana y/o de Gln¹⁰⁸ de IL-15 humana a la unidad γ del receptor de IL-15 humana;
- (6) unión a la IL-15 humana unida al receptor;
- (7) unión a IL-15 humana e inhibición de la capacidad de la IL-15 humana para inducir paraqueratosis;
- (8) unión a IL-15 humana e inhibición de la capacidad de IL-15 humana para inducir engrosamiento epidérmico;
- (9) unión a IL-15 humana e inhibición de la capacidad de IL-15 para inducir la proliferación de queratinocitos; y/o
- (10) unión a IL-15 humana e inhibición de la capacidad de la IL-15 humana para inducir quimiotaxis de leucocitos activados.

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Humanos para IL-15

Se pueden caracterizar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención para determinar su unión a IL-15 utilizando una variedad de técnicas conocidas. Generalmente, los anticuerpos se caracterizan inicialmente mediante ELISA. Brevemente, se pueden recubrir placas de microtitulación con IL-15 purificada en PBS, y después bloquearla con proteínas irrelevantes tales como albúmina de suero bovino (BSA) diluida en PBS. Se añaden diluciones de plasma de ratones inmunizados para IL-15 a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 y después se incuban con reactivo policlonal específico de Fc de IgG con un reactivo policlonal anti-IgG específico de Fc humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se revelaron con sustrato ABTS, y se analizaron a una DO de 405. Preferiblemente, se utilizarán para las fusiones ratones que desarrollen los títulos más elevados.

Se puede utilizar un análisis ELISA como se ha descrito más arriba para escrutar en busca de anticuerpos y, por tanto, de hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno IL-15. Los hibridomas que se unen, preferiblemente con elevada afinidad, a IL-15 se pueden subclonar y caracterizar adicionalmente. Después se puede seleccionar un clon de cada hibridoma, que conserva la reactividad de las células parentales (por medio de ELISA), para elaborar un banco de células, y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar anticuerpos anti-IL-15 humana, se pueden hacer crecer hibridomas seleccionados en botellas giratorias, matraces de agitación de dos litros u otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes se pueden filtrar y

concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar la proteína. Después del intercambio de tampón por PBS, se puede determinar la concentración mediante DO_{280} utilizando un coeficiente de extinción de 1,43 o preferiblemente mediante análisis nefelométrico. Se puede verificar la IgG mediante electroforesis en gel y mediante un método específico para antígenos.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-IL-15 humana seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado utilizando reactivos disponibles en el mercado (Pierce, Rockford, IL). Se puede detectar la unión del Mab biotinilado con una sonda marcada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipo utilizando mecanismos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden recubrir los pocillos de las placas de microtitulación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anti-Ig humana durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 5%, las placas se hacen reaccionar con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a la temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos se pueden hacer reaccionar después o bien con IgG1 humana o bien con otras sondas conjugadas específicas de isotipos humanos. Las placas se desarrollan y se analizan como se ha descrito más arriba.

Para someter a ensayo la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan IL-15, se puede utilizar la citometría de flujo. En resumen, se mezclan líneas celulares y/o PBMC humanas que expresan IL-15 unida a la membrana (desarrolladas en condiciones de crecimiento convencionales) con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA al 0,1% y NaN_3 al 0,01% a 4°C durante 1 hora. Después de lavar, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG humana marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar por medio de un aparato FACScan utilizando propiedades de luz y dispersión lateral para acotar las células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Se puede utilizar un análisis alternativo que utiliza la microscopía de fluorescencia (además o en lugar) del análisis de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente como se describe más arriba y examinar mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Se pueden someter a ensayo adicionalmente IgG anti-IL-15 humana para determinar la reactividad con el antígeno IL-15 mediante transferencia Western. Brevemente, se pueden preparar extractos celulares a partir de células que expresan IL-15 y someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecilsulfato de sodio. Después de la electroforesis, se transferirán los antígenos separados a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con suero de ratón al 20%, y se sondarán con los anticuerpos monoclonales que se van a someter a ensayo. Se puede detectar la unión a IgG humana utilizando anti-IgG humana con fosfatasa alcalina y revelar con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

II Producción de Animales no Humanos Transgénicos y Transcromosómicos Que Generan Anticuerpos Anti-IL-15 Monoclonales Humanos

En otro aspecto más, la invención proporciona animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que son capaces de expresar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención que se unen específicamente a IL-15. En una realización concreta, la invención proporciona un ratón transgénico o transcromosómico que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-IL-15 humanos de la invención cuando se inmuniza con antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15. El transgén de la cadena pesada humana puede ser integrado en el ADN cromosómico del ratón, como en el caso de los ratones transgénicos, *p. ej.*, HuMAb como se describe con detalle y se ilustra en la presente memoria. Como alternativa, el transgén de la cadena pesada humana se puede mantener extracromosómicamente, como en el caso de los ratones transcromosómicos (*p. ej.*, KM) como se describe en el documento WO 02/43478 (publicado el 6 de Junio de 2002). Tales ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para IL-15 (*p. ej.*, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El cambio de isotipo se puede producir, *p. ej.*, mediante cambio de isotipo clásico o no clásico.

El diseño de animales no humanos transgénicos o transcromosómicos que responden a la estimulación con un antígeno foráneo con un repertorio de anticuerpos heterólogos, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos en el animal transgénico funcionen correctamente en toda la ruta de desarrollo de las células B. Esto incluye, por ejemplo, el cambio de isotipo del transgén de la cadena pesada heteróloga. Por consiguiente, se construyen transgenes con el fin de que produzcan cambio de isotipo y uno o más de los siguientes anticuerpos: (1) expresión específica del tipo celular y de elevado nivel, (2) reordenamiento del gen funcional, (3) activación y respuesta a la exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de la señal, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del locus del anticuerpo transgénico durante la respuesta inmunitaria.

No es necesario satisfacer todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que los loci de la inmunoglobulina endógena del animal transgénico están interrumpidos funcionalmente, no se necesita que el transgén active la exclusión alélica. Adicionalmente, en aquellas realizaciones en las que el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de la cadena pesada y/o ligera reordenado funcionalmente, es innecesario el segundo criterio de reordenamiento del gen funcional, al menos para ese transgén que ya está reordenado. Para los

antecedentes sobre la inmunología molecular, véase, *Fundamental Immunology*, 2ª edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

5 En ciertas realizaciones, los animales no humanos transgénicos o transcromosómicos utilizados para generar anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina heteróloga reordenados, no reordenados o una combinación de reordenados y no reordenados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de la cadena pesada comprende al menos un gen C_H. Además, el transgén de la cadena pesada puede contener secuencias de cambio de isotipo funcionales, que son capaces de soportar el cambio de isotipo de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes C_H en las células B del animal transgénico. Tales secuencias de cambio pueden ser aquellas que existen naturalmente en el locus de la inmunoglobulina de la línea germinal de la especie que sirve como fuente de los genes C_H del transgén, o tales secuencias de cambio pueden derivar de las que existen en la especie que va a recibir el constructo del transgén (el animal transgénico). Por ejemplo, un constructo de un transgén humano que se utiliza para producir un ratón transgénico puede producir una mayor frecuencia de eventos de cambio de isotipo si incorpora secuencias de cambio similares a las que existen naturalmente en el locus de la cadena pesada de ratón, ya que presumiblemente las secuencias de cambio del ratón están optimizadas para funcionar con el sistema de enzima recombinasa de cambio del ratón, mientras las secuencias de cambio humanas no lo están. Las secuencias de cambio se pueden aislar y clonar mediante métodos de clonación convencionales, o se pueden sintetizar *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados basándose en la información de secuencias publicada referente a las secuencias de la región de cambio de la inmunoglobulina (Mills et al., *Nucl. Acids Res.* 15:7305-7316 (1991); Sideras et al., *Intl. Immunol.* 1:631-642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, los transgenes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera reordenados funcionalmente se encuentran en una fracción significativa de las células B de los animales transgénicos (al menos 10 por ciento).

25 Los transgenes utilizados para generar los animales transgénicos de la invención incluyen un transgén de la cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento del gen variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de la región constante. El transgén de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de la región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de la cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal no humano transgénico ya que derivan de, o corresponden a, ADN que codifica segmentos génicos de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano transgénico. En un aspecto de la invención, el transgén se construye de manera que los segmentos génicos individuales no estén reordenados, esto es, no reordenados con el fin de codificar una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Tales transgenes no reordenados apoyan la recombinación de los segmentos génicos V, D, y J (reordenamiento funcional) y preferiblemente apoyan la incorporación de todo o una porción del segmento génico de la región D en la cadena pesada de la inmunoglobulina reordenada resultante dentro del animal no humano transgénico cuando se expone al antígeno IL-15.

40 En una realización alternativa, los transgenes comprenden un "mini-locus" reordenado. Tales transgenes comprenden típicamente una porción sustancial de los segmentos C, D, y J así como un subgrupo de los segmentos del gen V. En tales constructos, las diferentes secuencias reguladoras, p. ej. promotores, intensificadores, regiones de cambio de clase, secuencias donadoras de empalmes y aceptoras para el procesamiento del ARN, señales de recombinación y similares, comprenden las correspondientes secuencias derivadas del ADN heterólogo. Tales secuencias reguladoras se pueden incorporar al transgén de la misma especie o de una especie relacionada del animal no humano utilizado en la invención. Por ejemplo, se pueden combinar segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia intensificadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Alternativamente, se pueden incorporar secuencias reguladoras sintéticas al transgén, donde tales secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional que se sabe que existe naturalmente en los genomas de los mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas se diseñan de acuerdo con reglas consenso, tales como, por ejemplo, aquellas que especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de empalme o un motivo promotor/intensificador. Por ejemplo, un minilocus comprende una porción del locus de inmunoglobulina genómico que tiene al menos una delección interna (esto es, no en el extremo de la porción) de una porción de ADN no esencial (p. ej., secuencia intermedia; intrón o porción del mismo) en comparación con el locus de Ig de la línea germinal de origen natural.

55 En una realización preferida de la invención, el animal transgénico o transcromosómico utilizado para generar anticuerpos humanos para IL-15 contiene al menos una, típicamente 2-10, y algunas veces 25-50 o más copias del transgén descrito en el Ejemplo 2 del documento WO 98/24884 (p. ej., pHC1 o pHC2) engendradas con un animal que contiene una única copia de un transgén de la cadena ligera descrito en los Ejemplos 5, 6, 8, o 14 del documento WO 98/24884, y el vástago engendrado con el animal con J_H suprimida descrito en el Ejemplo 10 del documento WO 98/24884. Los animales son engendrados hasta la homocigosis para cada uno de estos tres rasgos. Tales animales tienen el siguiente genotipo: una única copia (por juego haploide de cromosomas) de un minilocus no reordenado de la cadena pesada humana (descrito en el Ejemplo 12 del documento WO 98/24884), una única copia (por juego haploide de cromosomas) de un constructo de cadena ligera κ humana reordenada (descrito en el Ejemplo 14 del documento WO 98/24884), y una delección en cada locus de la cadena pesada de ratón endógena

que elimina todos los segmentos J_H funcionales (descrita en el Ejemplo 10 del documento WO 98/24884). Tales animales se engendran con ratones que son homocigotos para la delección de los segmentos J_H (Ejemplo 10 del documento WO 98/24884) para producir vástagos que son homocigotos para la delección J_H y hemicigotos para los constructos de la cadena pesada y ligera humana. A los animales resultantes se les inyectan antígenos y se utilizan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra estos antígenos.

Las células B aisladas de tal animal son monoespecíficas con respecto a las cadenas pesada y ligera humanas debido a que contienen solamente una única copia de cada gen. Además, serán monoespecíficas con respecto a las cadenas pesadas de ser humano o ratón debido a que ambas copias del gen de la cadena pesada de ratón endógenas son no funcionales en virtud de la delección que abarca la región J_H introducida como se describe en los Ejemplos 9 y 12 del documento WO 98/24884. Además, una fracción sustancial de las células B será monoespecífica con respecto a las cadenas ligeras humanas o de ratón debido a que la expresión de la única copia del gen de la cadena ligera κ humana reordenada excluirá alélicamente e isotópicamente la reordenación de los genes de la cadena κ y λ humana en una fracción significativa de las células B.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos empleados en la presente invención muestran producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, de manera ideal sustancialmente similar al de un ratón nativo. De este modo, por ejemplo, en las realizaciones en las que los genes de Ig endógenos han sido inactivados, los niveles de inmunoglobulina total oscilarán de alrededor de 0,1 a 10 mg/ml de suero, preferiblemente 0,5 a 5 mg/ml, idealmente al menos alrededor de 1,0 mg/ml. Cuando se ha introducido un transgén capaz de efectuar un cambio a IgG desde IgM en el ratón transgénico, la proporción en ratón adulto de IgG a IgM en suero es preferiblemente alrededor de 10:1. La razón de IgG a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de alrededor de 10%, preferiblemente 40 a 80% de las células B del bazo y el ganglio linfático expresan exclusivamente la proteína IgG humana.

El repertorio se aproximará idealmente al mostrado en un ratón nativo, normalmente al menos tanto como alrededor de 10%, preferiblemente 25 a 50% o más. Generalmente, se producirán al menos alrededor de mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferiblemente de 10^4 a 10^6 o más, dependiendo principalmente del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma del ratón. Estas inmunoglobulinas reconocerán típicamente alrededor de la mitad o más de las proteínas altamente antigénicas, p. ej., proteína A de *Staphylococcus*. Típicamente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad (K_D) para los antígenos preseleccionados inferior a 10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor.

En algunas realizaciones, puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la selección de genes V representados en la respuesta de anticuerpos a un tipo de antígeno predeterminado. Un transgén de la cadena pesada que tiene un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes V_H humanos que se utilizan preferentemente en respuestas de anticuerpos al tipo de antígeno predeterminado en seres humanos. Alternativamente, algunos genes V_H pueden ser excluidos de un repertorio definido por diferentes razones (p. ej., tener una baja probabilidad de codificar regiones V de alta afinidad para el antígeno predeterminado; tener una baja propensión a experimentar mutación somática y mejorar la afinidad; o ser inmunogénicos para ciertos seres humanos). De este modo, antes del reordenamiento de un transgén que contiene diferentes segmentos de genes de la cadena pesada o ligera, tales segmentos génicos pueden ser fácilmente identificados, p. ej., mediante hibridación o secuenciación del ADN, al ser de una especie de organismo distinta del animal transgénico.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos descritos más arriba se pueden inmunizar, por ejemplo, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IL-15 y/o células que expresan IL-15. Alternativamente, los ratones transgénicos se pueden inmunizar con ADN que codifica IL-15 humana. Los ratones producirán después células B que experimentan cambio de clase por medio de recombinación de cambio intratransgén (cambio cis) y expresan inmunoglobulinas reactivas con IL-15. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también referidos como "anticuerpos de secuencia humana"), donde los polipéptidos de la cadena pesada y ligera están codificados por secuencias de transgenes humanos, que pueden incluir secuencias derivadas mediante mutación somática y uniones recombinatorias de la región V, así como secuencias codificadas de la línea germinal; estos anticuerpos humanos pueden ser referidos por ser sustancialmente idénticos a una secuencia de polipéptidos codificada por un segmento génico de V_L o V_H humana y un segmento de J_L o D_H y J_H humana, incluso aunque puedan estar presentes otras secuencias que no sean de la línea germinal como resultado de mutación somática y uniones de recombinación de V-J y V-D-J diferencial. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo están codificadas típicamente al menos en un 80 por ciento por segmentos génicos V, J, de la línea germinal, y, en el caso de las cadenas pesadas, segmentos génicos D; frecuentemente al menos 85 por ciento de las regiones variables están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén; a menudo 90 o 95 por ciento o más de las secuencias de la región variable están codificadas por secuencias de la línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que las secuencias que no son de la línea germinal son introducidas por mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de la secuencia humana tendrán frecuentemente algunas secuencias de la región variable (y menos frecuentemente secuencias de la región constante) que no son codificadas por segmentos génicos V, D, o J humanos encontrados en los transgenes humanos de la línea germinal de los ratones. Típicamente, tales secuencias que no son de la línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones donde se sabe que se agrupan las mutaciones

somáticas.

Los anticuerpos humanos que se unen al antígeno predeterminado pueden resultar del cambio de isotipo, de manera que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena γ y de secuencia humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$, o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como kappa). Tales anticuerpos humanos de isotipo cambiado a menudo contienen una o más mutaciones somáticas, típicamente en la región variable y a menudo en o a aproximadamente 10 residuos de una CDR) como resultado de la maduración de afinidad y la selección de las células B por un antígeno, concretamente después de una sensibilización con antígeno secundario (o posterior). Estos anticuerpos humanos de alta afinidad pueden tener afinidades de unión (K_D) de menos de 10^{-7} M, tal como menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior.

Otro aspecto de la invención incluye células B derivadas de ratones transgénicos o transcromosómicos como se describe en la presente memoria. Las células B pueden ser utilizadas para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con una elevada afinidad (p. ej., inferior a 10^{-7} M) a IL-15 humana. De este modo, en otra realización, la invención proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo humano de la invención que tiene una afinidad (K_D) menor de 10^{-7} M, por ejemplo menor de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIACORE 3000 utilizando IL-15 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando para la unión a IL-15 humana, donde el anticuerpo comprende:

una cadena ligera de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de V_L humano y un segmento de J_L humano, y (2) una región constante de la cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de C_L humano; y
una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de V_H humano, opcionalmente una región D, y un segmento de J_H humano, y (2) una región constante que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de C_H humano.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra IL-15 se puede facilitar mediante un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de la región variable humana en un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humano integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén del gen V que comprende segmentos génicos de la región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. A menudo, el transgén de la región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una porción de la matriz de segmentos génicos V_H o $V_L(V_K)$ humanos, ya que puede existir naturalmente en un genoma humano o ya que pueden ser empalmados juntos de manera separada mediante métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos del gen V fuera de orden u omitidos. A menudo al menos cinco o más segmentos del gen V funcional están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible elaborar un ratón transgénico producido mediante el método de expansión del repertorio de V, donde el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de la región variable codificada por un segmento génico de la región V presente en el transgén de la región V y una región C codificada en el transgén Ig humano. Por medio del método de expansión del repertorio de V, se pueden generar ratones transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; como también se pueden generar ratones que contienen al menos alrededor de 24 genes V o más. Algunos segmentos del gen V pueden ser no funcionales (p. ej., pseudogenes y similares); estos segmentos pueden ser conservados o pueden ser suprimidos selectivamente mediante métodos recombinantes asequibles para los expertos en la técnica, si se desea.

Una vez que se ha diseñado la línea germinal de ratón para que contenga un YAC funcional que tiene un repertorio del segmento V ampliado, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humano que contiene los segmentos génicos de J y C, se puede propagar el rasgo y engendrarlo en otros fondos genéticos, incluyendo fondos en los que el YAC funcional que tiene un repertorio de segmentos V ampliado es producido en una línea germinal de ratón que tiene un transgén de Ig humana diferente. Se pueden introducir múltiples YAC funcionales que tienen un repertorio de segmentos V ampliado en una línea germinal para trabajar con un transgén de Ig humana (o múltiples transgenes de Ig humana). Aunque son referidos en la presente memoria como transgenes YAC, tales transgenes cuando están integrados en el genoma pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como las secuencias requeridas para la replicación autónoma en levaduras; tales secuencias pueden ser separadas opcionalmente mediante ingeniería genética (p. ej., digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) una vez que la replicación en levadura ya no es necesaria (esto es, antes de la introducción en una células ES de ratón o un procigoto de ratón). Los métodos de propagación del rasgo de la expresión de la inmunoglobulina de secuencia humana, incluyen criar un ratón transgénico que tiene los transgenes de Ig humana, y opcionalmente que también tiene un YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V ampliado. Los segmentos de los genes tanto V_H como V_L pueden estar presentes en el YAC. El ratón transgénico puede ser criado en cualquier fondo deseado por el profesional, incluyendo fondos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humana y/o transgenes que codifican otras proteínas linfocíticas humanas. Un ratón transgénico

que tiene un transgén YAC del repertorio de la región V ampliado puede producir una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad. Aunque lo anterior describe una realización preferida de los animales transgénicos de la invención, se contemplan otras realizaciones que han sido clasificadas en cuatro categorías:

- 5 I. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina pesada no reordenada y ligera reordenada;
 II. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina pesada no reordenada y ligera no reordenada;
 10 III. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina pesada reordenada ligera no reordenada; y
 IV. Animales transgénicos que contienen transgenes de inmunoglobulina pesada reordenada y ligera reordenada.

15 De estas categorías de animales transgénicos, el orden de preferencia preferido es el siguiente II > I > III > IV cuando los genes de la cadena ligera endógenos (o al menos el gen K) han sido desactivados mediante recombinación homóloga (u otro método) y I > II > III > IV cuando los genes de la cadena ligera endógenos no han sido desactivados y deben ser dominados por exclusión alélica.

20 III. Productos Conjugados de Anticuerpo/Inmunotoxinas

En otro aspecto, la presente invención ofrece un anticuerpo monoclonal anti-IL-15 humano de la invención conjugado con un radical terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (*p. ej.*, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos productos conjugados de anticuerpo son referidos como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (*p. ej.*, elimine)
 25 las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaina, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no están imitados a, antimetabolitos (*p. ej.*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (*p. ej.*, mecloretamina, tioepa-clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*p. ej.*, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*p. ej.*, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (*p. ej.*, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con un radioisótopo, *p. ej.*, yodo radiactivo, para generar radiofármacos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con IL-15, tal como un cáncer.

Los productos conjugados de anticuerpo de la invención se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada. No se considera que el radical terapéutico está limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el radical del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otras citoquinas o factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales radicales terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véanse, *p. ej.*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

IV. Composiciones Farmacéuticas

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, *p. ej.*, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o una o varias porciones de unión al antígeno de los mismos, de la presente invención, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (*p. ej.*, dos o más) anticuerpos humanos aislados de la invención. Preferiblemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une a un epítipo de IL-15 pre-seleccionado, distinto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia combinada, esto es, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes anti-inflamatorios, FARME (fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, quimioterapéuticos, y agentes para la psoriasis. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar junto con terapia de radiación. La administración simultánea con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos de CD4 y anticuerpos específicos de IL-2, también está incluida en la invención. Tales combinaciones con anticuerpos específicos de CD4 o anticuerpos específicos de IL-2 se consideran particularmente útiles para tratar enfermedades autoinmunitarias y rechazos de transplantes.

Según se utiliza en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (*p. ej.*, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, esto es, el anticuerpo, molécula biespecífica o multiespecífica, se puede recubrir con un sustancia para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase *p. ej.*, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen las sales de adición de ácido y las sales de adición de álcalis. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de álcalis incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Se puede administrar una composición de la presente invención por medio de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará un experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración dependerán de los resultados deseados. Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto de su liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poli(ortoésteres), y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, *p. ej.*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por medio de ciertas rutas de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o administrar el compuesto simultáneamente con, una sustancia para evitar su inactivación. Por ejemplo, se puede administrar el compuesto a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampones acuosos. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua CGF así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Salvo en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas deben ser por lo general estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular en forma de una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula adecuado en el caso de una dispersión y por medio del uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede ocasionar la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados más arriba, según se requiera,

seguido de microfiltración para la esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados más arriba. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado a vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada para la esterilización de la misma.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (*p. ej.*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar proporcionalmente la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, se pueden administrar los anticuerpos humanos de la invención una vez o dos veces por semana mediante inyección subcutánea o una vez o dos veces al mes mediante inyección subcutánea. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria según se utiliza en la presente memoria hace referencia a unidades discretas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; cada unidad contiene una cantidad previamente determinada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención vienen dictadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

Los ejemplos de los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bisulfato de sodio, metabosulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con una sustancia portadora para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando, y del modo de administración concreto. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con una sustancia portadora para producir una única forma de dosificación será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, excepto el cien por cien, esta cantidad oscilará de alrededor de 0,001 por ciento a alrededor de noventa por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de alrededor de 0,005 por ciento a alrededor de 70 por ciento, muy preferiblemente de alrededor de 0,01 por ciento a alrededor de 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para su pulverización que contienen portadores conocidos en la técnica por ser apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta invención incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o propelente que se pueda requerir.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" según se utilizan en la presente memoria representan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente por medio de inyección, e incluyen, sin limitación, inyecciones e infusiones intramusculares, intraarteriales, intratecales, intracapsulares, intraorbitales, intracardiácas, intradérmicas, intraperitoneales, transtraqueales, subcutáneas, subcuticulares, intraarticulares, subcapsulares, subaracnoideas, intraespinales, epidurales e intrasternales.

Los ejemplos de los portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y las mezclas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por medio del uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones.

Además, se puede ocasionar la absorción prolongada de la forma inyectable por medio de la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Cuando los compuestos de la presente invención se administran en forma de fármacos, a seres humanos y animales, se pueden administrar solos o en forma de una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,001 a 90% (más preferiblemente, 0,005 a 70%, tal como 0,01 a 30%) de ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Con independencia de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

15 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición, y un modo de administración concretos, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de la misma, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto concreto que esté siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados combinados con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que esté siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tenga un conocimiento práctico normal en la técnica podrán determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que esté en la dosis mínima eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos más arriba. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, preferiblemente administrada próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de de una composición terapéutica se puede administrar en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo de todo el día, opcionalmente en formas de dosificación unitarias. Si bien es posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto en forma de una formulación farmacéutica (composición).

Se pueden administrar composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 4.596.556. Los ejemplos de los implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.487.603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para liberar medicación a una velocidad de infusión precisa; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la liberación continua de fármaco; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.439.196, que describe un sistema de liberación de fármaco osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.475.196, que describe un sistema de liberación de fármaco osmótico. Muchos otros de tales implantes, sistemas de liberación, y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para asegurar una distribución *in vivo* apropiada. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurarse de que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, *p. ej.*, las Patentes de los Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más radicales que son transportados selectivamente al interior de células u órganos específicos, intensificando de este modo la liberación dirigida del fármaco (véase, *p. ej.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los radicales de redireccionamiento ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptores de proteína A del tensioactivo (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida,

los liposomas incluyen un radical de direccionamiento. En una realización muy preferida, los compuestos terapéuticos de los liposomas son liberados mediante inyección de bolo en un sitio próximo al tumor o la infección. La composición debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la artritis reumatoide dará como resultado una Definición de Mejoría Preliminar ACR20 en los pacientes, más preferida una Definición de Mejoría Preliminar ACR50 e incluso más preferida una Definición de Mejoría Preliminar ARCD70.

La Definición de Mejoría Preliminar ACR20 se define como: una mejoría de $\geq 20\%$ en: Recuento de Articulaciones Sensibles (RAS) y Recuento de Articulaciones Hinchadas (RAH) y $\geq 20\%$ de mejoría en 3 de las 5 siguientes evaluaciones: Evaluación de Dolor del Paciente (EDP), Evaluación Global del Paciente (EGP), Evaluación Global por el Médico (EGM), Autoevaluación de la Discapacidad por Parte del Paciente (ADPP), Reaccionantes de la Fase Aguda (RFA).

ACR50 y ACR70 se definen de la misma manera con mejorías de $\geq 50\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Para detalles adicionales véase Felson et al. en American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism (1995) 38: 727-735.

La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad de inhibición del compuesto, tal inhibición se puede determinar por medio de análisis *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o aliviar de otro modo los síntomas en el sujeto. Un experto normal en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o ruta de administración concretas seleccionadas.

La capacidad de los anticuerpos para tratar o prevenir la psoriasis también se puede evaluar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

La composición debe ser estéril y fluida hasta el punto de que la composición sea liberable por medio de una jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por medio del uso de revestimientos tales como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y por medio del uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Se puede ocasionar la absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se ha descrito más arriba, el compuesto se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

V. Usos y Métodos de la Invención

Los anticuerpos anti-IL-15 humanos para IL-15 de la presente invención (incluyendo derivados y productos conjugados de los anticuerpos) y las composiciones que contienen los anticuerpos se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*.

En una realización, los anticuerpos humanos de la invención se utilizan para inhibir la producción de TNF α por células T y/o monocitos/macrófagos inducida por IL-15, preferiblemente sin inhibir la producción de TNF α inducida por otras citoquinas, tales como IL-2. Poniendo en contacto el anticuerpo con IL-15 (*p. ej.*, mediante la administración del anticuerpo al sujeto), se inhibe la capacidad de IL-15 para señalar a través del receptor de IL-15 y, de ese modo, también se inhibe la producción de TNF α por las células T y/o monocitos/macrófagos. Los anticuerpos preferidos se unen a los epítomos (*p. ej.*, subunidades concretas, tales como la subunidad gamma) que son específicas para IL-15 y, de este modo, inhiben ventajosamente la producción de TNF α inducida por IL-15, pero no interfieren en la producción de TNF α por las citoquinas relacionadas estructuralmente, tales como IL-2.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención se utilizan para inhibir el reclutamiento y/o la proliferación de células T inducidos por IL-15, preferiblemente sin inhibir la proliferación de células T inducida por otras citoquinas relacionadas estructuralmente, tales como IL-2. Como con la producción de TNF α , poniendo en contacto el anticuerpo con IL-15 (*p. ej.*, administrando el anticuerpo a un sujeto), la capacidad de IL-15 para señalar a través del receptor de IL-15 es inhibida y, de este modo, la estimulación de las células T por IL-15 es inhibida.

Por consiguiente, en otra realización más, la presente invención proporciona anticuerpos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento o prevención de un trastorno mediado por IL-15 (*p. ej.*, una enfermedad autoinmunitaria, tal como la psoriasis, la artritis reumatoide, o la enfermedad inflamatoria intestinal, o una enfermedad infecciosa, tal como VIH), administrando a un sujeto un anticuerpo humano de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. El anticuerpo se puede administrar solo o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente anti-inflamatorio, *p. ej.*, un agente inflamatorio esteroideo o no esteroideo, o una citotoxina que actúa junto con o sinérgicamente con el anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad mediada por IL-15.

En una realización concreta, los anticuerpos humanos de la presente invención se utilizan para tratar o para prevenir la artritis reumatoide (AR). Los anticuerpos limitan el papel que juega la IL-15 en el progreso de la inflamación asociada con enfermedades tales como la AR. Las células T, concretamente las células T coadyuvantes CD4+, están implicadas en el inicio y el mantenimiento de los procesos inflamatorios en la AR. El TNF- α , otra citoquina, también está implicado en las rutas inflamatorias con conduciendo por último a la destrucción de la articulación y a la incapacidad del paciente con AR. La síntesis local de IL-15 juega un papel clave tanto en la activación como en el reclutamiento de las células T y en la inducción de TNF- α y otras citoquinas inflamatorias. El papel de IL-15 en el progreso de la AR implica un proceso por medio del cual la IL-15, que es sintetizada en macrófagos, induce el reclutamiento de células T. Las células T activadas después: (1) mantienen la activación de los macrófagos; y (2) inducen la producción de TNF- α . Los macrófagos estimulados promueven la síntesis de más IL-15 y la activación de células T, continuando de ese modo el ciclo. Además de sus efectos sobre el TNF- α y los macrófagos, la IL-15 también activa los neutrófilos y afecta a la secreción de inmunoglobulina de las células B locales, concretamente la síntesis de factor reumatoide.

Por consiguiente, se pueden utilizar los anticuerpos anti-IL-15 de la invención para evitar o bloquear los efectos anteriores de IL-15 que ocasionan la AR y, de este modo, se pueden utilizar para prevenir o tratar esta enfermedad. Por ejemplo, se pueden utilizar los anticuerpos anti-IL-15 de la invención para inhibir la inflamación y/o prevenir la quimiotaxis de los leucitos activados implicados en la AR.

Los anticuerpos humanos de la presente invención se pueden utilizar para la inhibición del progreso del daño estructural en pacientes con artritis reumatoide que han tenido una respuesta inadecuada al metotrexato para reducir los signos y síntomas y retrasar el daño estructural en pacientes con una artritis reumatoide gravemente activa, incluyendo aquellos que no han tenido previamente un tratamiento fallido con un FARME.

Los anticuerpos humanos de la presente invención también se pueden utilizar para bloquear o inhibir otros efectos de IL-15. La IL-15 es expresada en diferentes células y tejidos incluyendo monocitos y macrófagos, fibroblastos, células dendríticas, y queratinocitos. Los queratinocitos son los constituyentes principales de la epidermis y el revestimiento epitelial del tejido mucosal. El control del crecimiento de queratinocitos está mediado por una compleja red de citoquinas y factores de crecimiento, algunas de las cuales son producidas por los propios queratinocitos. La IL-15 derivada de queratinocitos contribuye a la acumulación, proliferación, y supervivencia de las células T en placas psoriásicas. Se conocen muchas enfermedades en las que aumenta el número de queratinocitos lo que conduce a una hiperplasia epidérmica que es responsable de al menos algunos de los síntomas de las enfermedades relacionadas. Estas enfermedades incluyen enfermedades crónicas tales como la psoriasis y la dermatitis atópica, así como afecciones como el eczema crónico de las manos, la dermatitis de contacto, verrugas virales (asociadas al VPH), el linfoma de células T cutáneo, curación lenta de tejidos, tal como la curación lenta de heridas debida a diabetes. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar en métodos para el tratamiento o prevención de tales trastornos administrando a los pacientes un anticuerpo anti-IL-15 humano de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-15 de la invención se pueden utilizar para bloquear o inhibir la paraqueratosis en la psoriasis, reducir el grosor epidérmico en la psoriasis, y reducir la proliferación de queratinocitos en la psoriasis.

La IL-15 también modula la función de las células epiteliales intestinales (Reinecker, et al. (1996) Gastroenterology 111:1706-13). Específicamente, la IL-15 puede causar modificaciones sobre las células epiteliales mucosales y sobre las líneas de células epiteliales intestinales y, por lo tanto, está implicada en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales, *p. ej.*, la enfermedad celíaca. El papel de IL-15 en tales enfermedades se demuestra por la representación en exceso selectiva de células IL-15+ en el intestino delgado de pacientes no tratados con enfermedad celíaca (Documento WO 00/02582). De este modo, se ha demostrado que IL-15 está directamente implicada en el inicio y mantenimiento de la enfermedad celíaca. Por consiguiente, en otra realización, se pueden utilizar los anticuerpos anti-IL-15 humanos de la presente invención (esto es, que inhiben los efectos pro-inflamatorios de IL-15) para tratar y/o prevenir la enfermedad celíaca administrando el anticuerpo a un paciente en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

Además, los autores de la presente invención han descubierto que IL-15 también promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso llamado neovascularización o angiogénesis. Por consiguiente, otro uso más de los anticuerpos de la invención incluye la prevención o el tratamiento de enfermedades que implican neovascularización. Estas enfermedades incluyen una variedad de cánceres que están basados en o se caracterizan por la neovascularización, además de enfermedades inflamatorias.

Los anticuerpos humanos de la presente invención también se pueden utilizar para bloquear o inhibir los efectos de IL-15 asociados con enfermedades infecciosas, por ejemplo por VIH. Por consiguiente, otro uso de los anticuerpos de la invención incluye la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas, p. ej., por VIH-1.

Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar *in vitro* o *in vivo* para diagnosticar una variedad de enfermedades mediadas por IL-15. Específicamente, los anticuerpos se pueden utilizar para detectar niveles de IL-15, o niveles de células que contienen IL-15 sobre su superficie de membrana o unida a sus receptores (IL-15 humana unida a receptores). La detección de tales niveles de IL-15 puede guardar relación con los síntomas de ciertas enfermedades. Alternativamente, se pueden utilizar los anticuerpos para inhibir o bloquear la función de IL-15 que, a su vez, puede evitar o aliviar los síntomas de enfermedades causadas por la función de IL-15.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-IL-15 humanos de la invención se pueden administrar simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos, p. ej., un agente inmunosupresor o un agente anti-inflamatorio para incrementar el efecto anti-inflamatorio global. El anticuerpo se puede unir al agente (en forma de un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o al mismo tiempo que el agente. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, entre otros, agentes anti-inflamatorios, FARME (fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, agentes quimioterapéuticos, y agentes para la psoriasis. Los anticuerpos humanos de acuerdo con la invención también se pueden administrar junto con la terapia por radiación.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención se pueden administrar combinados con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos para CD4 y anticuerpos específicos para IL-2. Una combinación de los presentes anticuerpos humanos con anticuerpos específicos para CD4 o anticuerpos específicos para IL-2 se considera particularmente útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y para los rechazos de transplantes.

También se describen en la presente memoria kits que comprenden los anticuerpos anti-IL-15 humanos de la invención y, opcionalmente, las instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, o uno o más anticuerpos humanos de la invención adicionales (p. ej., un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno de IL-15 distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, los pacientes tratados con los anticuerpos de la invención se pueden administrar adicionalmente (antes, simultáneamente, o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente terapéutico, tal como un agente anti-inflamatorio, que intensifica o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otra realización más, se pueden utilizar los anticuerpos humanos de la invención para dirigir compuestos (p. ej., agentes terapéuticos, marcas, citotoxinas, inmunosupresores etc.) a células que tienen IL-15 unida a su superficie (p. ej., unida a membrana o unida a receptor de IL-15 conectando tales compuestos con el anticuerpo. De este modo, también se describen en la presente memoria los métodos para localizar *ex vivo*, *in vivo* o *in vitro* células que expresan IL-15 y receptor de IL-15 (p. ej., con una marca detectable, tales como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor enzimático).

Otras realizaciones de la presente invención se describen en los siguiente Ejemplos.

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitantes adicionalmente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Generación de ratones con Cmu redireccionado

Construcción de un vector de redireccionamiento CMD

El plásmido pICEmu contiene un fragmento EcoRI/XhoI del locus de la cadena pesada de la Ig murina, que abarca el gen, que fue obtenido de una genoteca de fagos lambda genómica de Balb/C (Marcu et al. Cell 22: 187, 1980). Este fragmento genómico se subclonó en los sitios XhoI/BcoRI del plásmido pICEM19H (Marsh et al; Gene 32, 481-485, 1984). Las secuencias de la cadena pesada incluidas en pICEmu se extendían aguas abajo del sitio EcoRI localizado inmediatamente 3' del intensificador intrónico de mu, hacia el sitio XhoI localizado aproximadamente 1 kb aguas abajo del último exón transmembrana del gen mu; sin embargo, una gran parte de la región de repetición de cambio de mu ha sido suprimida mediante su pase por *E. coli*.

El vector de redireccionamiento se construyó como sigue. Se separó mediante corte el fragmento HindIII/SmaI de 1,3 kb de pICEmu y se subclonó en pBluescript digerido con HindIII/SmaI (Stratagene, La Jolla, CA). Este fragmento

pICEmu se extiende desde el sitio HindIII localizado a aproximadamente 1 kb 5' de Cmul al sitio SmaI localizado en Cmul. El plásmido resultante fue digerido con SmaI/Spel y se insertó el fragmento SmaI/XbaI de aproximadamente 4 kb de pICEmu, que se extiende desde el sitio SmaI en Cmul 3' al sitio XbaI localizado inmediatamente aguas abajo del último exón Cmu. El plásmido resultante, pTAR1, se linealizó en el sitio SmaI, y se insertó una casete de expresión neo. Esta casete consiste en el gen neo bajo el control transcripcional del promotor de fosfoglicerato quinasa de ratón (pgk) (fragmento XbaI/TaqI; Adra et al. (1987) Gene 60: 65-74) y que contiene el sitio de poliadenilación de pgk (fragmento PvuII/HindIII; Boer et al. (1990) Biochemical Genetics 28: 299-308). Esta casete se obtuvo del plásmido pKJ1 (descrito por Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163) a partir del cual se separó por corte la casete de neo en forma de un fragmento EcoRI/HindIII y se subclonó en pGEM-7Zf (+) digerido con EcoRI/HindIII para generar pGEM-7 (KJ1). La casete de neo se separó por corte de pGEM-7 (KJ1) mediante digestión con EcoRI/Sall, sus extremos se volvieron romos y se subclonó en el sitio SmaI del plásmido pTAR1, en la orientación opuesta de las secuencias Cmu genómicas. El plásmido resultante se linealizó con NotI, y se insertó una casete con la timidina quinasa (tk) del virus herpes simplex para permitir el enriquecimiento de clones ES que portaban recombinantes homólogos, como describen Mansour et al. (1988) Nature 336: 348-352. Esta casete consiste en las secuencias codificantes del gen tk delimitadas por el promotor y el sitio de poliadenilación pgk de ratón, como describen Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163. El vector de redireccionamiento CMD resultante contiene un total de aproximadamente 5,3 kb de homología con el locus de la cadena pesada y se diseñó para que genere un gen mu mutante en el cual se ha insertado una casete de expresión de neo en el único sitio SmaI del primer exón Cmu. El vector de redireccionamiento se linealizó con PvuII, que corta en las secuencias del plásmido, antes de la electroporación en células ES.

Generación y análisis de células ES dirigidas

Se hicieron crecer células ES AB-1 (McMahon, A. P. y Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073-1085) sobre capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (idem) esencialmente como se ha descrito (Robertson, E. J. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, págs. 71-112). El vector de redireccionamiento CMD linealizado fue sometido a electroporación en células AB-1 mediante los métodos descritos por Hasty et al. (Hasty, P. R. et al. (1991) Nature 350: 243-246). Las células sometidas a electroporación se cultivaron en placa en placas de 100 mm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/placa. Después de 24 horas, se añadieron G418 (200 microgramos/ml de componente activo) y FIAU (5×10^{-7} M) al medio, y se dejó que se desarrollaran clones resistentes al fármaco a lo largo de 8-9 días. Se seleccionaron los clones, se tripsinizaron, se dividieron en porciones, y se expandieron adicionalmente. La mitad de las células derivadas de cada clon se congeló después y la otra mitad se analizó para determinar la recombinación homóloga entre las secuencias del vector y las secuencias diana.

Se llevó a cabo el análisis del ADN mediante hibridación por transferencia Southern. Se aisló el ADN de los clones como describen Laird et al. (Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293). El ADN genómico aislado se digirió con Spel y se sondeó con un fragmento SacI de 915 pb, sonda A (véase la Figura 1), que hibrida con una secuencia entre el intensificador intrónico de mu y la región de cambio de mu. La sonda A detecta un fragmento Spel de 9,9 kb del locus de tipo salvaje, y una banda de 7,6 kb diagnóstica del un locus de mu que ha sido recombinado homológamente con el vector de redireccionamiento CMD (la casete de expresión de neo contiene un sitio Spel). De los 1132 clones resistentes a G418 y FIAU escrutados mediante análisis de transferencia Southern, 3 presentaron la banda Spel de 7,6 kb indicativa de recombinación homóloga en el locus de mu. Estos 3 clones fueron digeridos adicionalmente con las enzimas BglII, BstXI, y EcoRI para verificar que el vector se integraba homológamente en el gen mu. Cuando se hibridaban con la sonda A, las transferencias Southern del ADN de tipo salvaje digerido con BglII, BstXI, o EcoRI producían fragmentos de 15,7, 7,3, y 12,5 kb, respectivamente, mientras la presencia de un alelo mu dirigido es indicada por los fragmentos de 7,7, 6,6, y 14,3 kb, respectivamente. Los 3 clones positivos detectados por el producto digerido Spel mostraron los fragmentos de restricción BglII, BstXI, y EcoRI esperados diagnósticos de la inserción de la casete de neo en el exón Cmul.

Generación de ratones que portan el gen mu mutado

Los tres clones ES dirigidos, designados con los números 264, 272, y 408, fueron descongelados e inyectados en blastocistos C57BL/6J como describe Bradley (Bradley, A. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, págs. 113-151). Los blastocitos inyectados fueron transferidos a los úteros de hembras pseudopreñadas para generar ratones quiméricos que representan una mezcla de células derivadas de las células ES de entrada y los blastocitos del anfitrión. El grado de contribución de las células ES a la quimera se puede estimar visualmente por medio de la cantidad de coloración de capa Agoutí, derivada de la línea celular ES, sobre el fondo C57BL/6J negro. Los clones 272 y 408 produjeron solamente un bajo porcentaje de quimeras (esto es, bajo porcentaje de pigmentación Agoutí) pero el clon 264 produjo un elevado porcentaje de quimeras macho. Estas quimeras se engendraron con hembras C57BL/6J y se generaron vástagos Agoutí, indicativos de transmisión de la línea germinal del genoma de las células ES. El escrutinio para determinar el gen mu redireccionado se llevó a cabo mediante análisis de transferencia Southern de ADN de biopsias de cola digerido con BglII (como se ha descrito más arriba para el análisis de ADN de células ES). Aproximadamente el 50% de los vástagos Agoutí mostraron una banda de hibridación de BglII de 7,7 kb además de la banda de tipo salvaje de 15,7 kb, demostrando una transmisión de la línea germinal del gen mu redireccionado.

Análisis de ratones transgénicos para determinar la inactivación funcional del gen mu

Para determinar si la inserción de la casete de neo en Cmul ha inactivado el gen de la cadena pesada de Ig, se cruzó una quimera del clon 264 con un ratón homocigoto para la mutación JHD, que inactiva la expresión de la cadena pesada como resultado de la delección los segmentos del gen JH (Chen et al., (1993) Immunol. 5: 647-656). Se generaron cuatro vástagos Agoutí. Se obtuvo suero de estos animales a la edad de 1 mes y se analizaron mediante ELISA para determinar la presencia de IgM murina. Dos de los cuatro vástagos carecían completamente de IgM (véase la Tabla 1). La genotipificación de los cuatro animales mediante análisis de transferencia Southern del ADN de biopsias de cola mediante digestión con BglI e hibridación con la sonda A (véase la Figura 1), y mediante digestión con StuI e hibridación con un fragmento EcoRI/StuI de 475 pb (idem) demostró que los animales que no logran expresar la IgM en suero son aquellos en los que un alelo del locus de la cadena pesada porta la mutación JHD, el otro alelo la mutación Cmul. Los ratones heterocigotos para la mutación JHD presentan niveles de Ig en suero de tipo salvaje. Estos datos demuestran que la mutación Cmul inactiva la expresión del gen mu.

TABLA 1

Ratón	IgM de Suero (microgramos/ml)	Genotipo de la cadena H de Ig
42	<0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129xBL6F1	153	+/+
JHD	<0,002	JHD/JHD

La Tabla 1 muestra los niveles de IgM en suero, detectados mediante ELISA, para ratones que portan las mutaciones tanto CMD como JHD (CMD/THD), para ratones heterocigotos para la mutación JHD (+/JHD), para ratones de tipo salvaje (129Sv x C57BL/6J)F1 (+/+), y para ratones carentes de células B homocigotos para la mutación JHD (JHD/JHD).

Ejemplo 2 Generación de ratones transgénicos HCO12**El transgén HCO12 de la cadena pesada humana**

El transgén HCO12 se generó mediante inyección simultánea del inserto de 80 kb de pH2 (Taylor et al., 1994, Int. Immunol., 6: 579-591) y el inserto de 25 kb de pVx6. El plásmido pVx6 se construyó como se describe más abajo.

Un fragmento de ADN HindIII/Sall de 8,5 kb, que comprendía el gen 1-18 de V_H humana de la línea germinal (DP-14) junto con aproximadamente 2,5 kb de la secuencia genómica colindante 5', y 5 kb de la 3' se subclonó en el vector plasmídico pSP72 (Promega, Madison, WI) para generar el plásmido p343.7.16. Un fragmento de ADN BamHI/HindIII de 7 kb, que comprendía el gen 5-51 de V_H humana de la línea germinal (DP-73) junto con aproximadamente 5 kb de la secuencia genómica colindante 5' y 1 kb de la 3', se clonó en el vector de clonación pGP1f basado en pBR322 (Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295), para generar el plásmido p251f. Un nuevo vector de clonación derivado de pGP1f, pGP1k (SEQ ID NO: 13), fue digerido con EcoRV/BamHI, y ligado a un fragmento de ADN EcoRV/BamHI de 10 kb, que comprendía el gen 3-23 de V_H humana de la línea germinal (DP47) junto con aproximadamente 4 kb la secuencia genómica colindante 5' y 5 kb de la 3'. El plásmido resultante, p112.2RR.7, fue digerido con BamHI/Sall y ligado con el inserto BamHI/Sall purificado de 7 kb de p251f. El plásmido resultante, pVx4, fue digerido con XhoI y ligado con el inserto XhoI/Sall de 8,5 kb de p343.7.16.

Se obtuvo un clon con el gen 1-18 de V_H en la misma orientación que los otros dos genes V. Este clon, designado pVx6, fue digerido después con NotI el inserto de 26 kb purificado inyectado simultáneamente con el inserto NotI de 80 kb de pH2 a una razón molar 1:1 – en los pronúcleos de embriones de medio día (C57BL/6J x DBA/2J)F2 como describen Hogan *et al.* (B. Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2ª edición, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY). Tres líneas independientes de ratones transgénicos que comprendían las secuencias tanto de Vx6 como de HC2 fueron establecidas a partir de los ratones que se desarrollaron a partir de los embriones inyectados. Estas líneas fueron designadas (HCO12)14881, (HCO12)15083, y (HCO12)15087. Cada una de las tres líneas fue cruzada después con ratones que comprendían la mutación CMD descrita en el Ejemplo 1, la mutación JKD (Chen et al. 1993, EMBO J. 12: 811-820), y el transgén (KCo5)9272 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851). Los ratones resultantes expresan los transgenes de la cadena pesada y ligera kappa humana en un fondo homocigoto para la desorganización de los loci de la cadena pesada y ligera kappa de ratón endógenos.

Ejemplo 3 Producción de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra IL-15

5 Se inmunizaron ratones transgénicos HCo12 y HCo7, generados como se ha descrito más arriba y suministrados de Medarex, San José, CA, Estados Unidos, con IL-15 humana recombinante (hIL-15, Immunex corp., Seattle, Estados Unidos) con un suplemento de Coadyuvante Completo de Freund (CFA, lote núm. 121024LA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos) o con Coadyuvante Incompleto de Freund (ICFA, lote núm. 121195LA, Difco, subcutáneamente (SC) intraperitonealmente (IP) o intravenosamente (IV). En varios casos la hIL-15 se acopló a KLH según se utiliza para la inmunización. Después de varios refuerzos con hIL-15 con un suplemento de Coadyuvante
10 Completo o Incompleto de Freund, el suero de los ratones se sometió a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos humanos dirigidos contra IL-15.

Esquemas de Inmunización de los ratones transgénicos que dan como resultado los clones finales 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8

15 **Ratón núm. 146 (HCo12), ID 995-146, Hembra**

170699	SC	12 µg hIL-15 en CFA (Difco, Lote núm. 121024LA)
010799	SC	12 µg hIL-15 en ICFA (Difco, Lote núm. 121195LA)
150799	SC	12 µg hIL-15 en ICFA
020899	SC	12 µg hIL-15-KLH en ICFA
070999	SC	12 µg hIL-15-KLH en ICFA
280999	SC	12 µg hIL-15-KLH en CFA
111099	IV	30 µg hIL-15 en PBS
121099	IV	30 µg hIL-15 en PBS
151099		fusión células de ganglio linfático y bazo de este ratón con SP2/0

20 **Ratón núm. 404 (HCo7), ID 997-404, Hembra**

201099	IP	25 µg de hIL-15-KLH en CFA (Difco, lote núm. 121024LA)
031199	IP	12,5 µg de hIL-15, 12,5 µg de hIL-15-KLH, 25 µg en ICFA (Difco, lote núm. 121195LA)
101199	IV	12,5 µg de hIL-15, 12,5 µg de hIL-15-KLH
121199	IV	12,5 µg de hIL-15, 12,5 µg de hIL-15-KLH
191199		fusión de células de ganglio linfático y bazo de este ratón con SP2/0

Medios de cultivo

25 **Medio de Compañero de Fusión (FPM):**

Se añadió un suplemento de 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, Piruvato de Na 1 mM, β-mercaptoetanol 0,5 mM (Life Technologies, Paisley, Escocia) y suero de ternera fetal inactivado con calor al 10% (HyClone, Utah, Estados Unidos) a Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

30 **Medio de Selección de Fusión (FSM):**

FPM con un suplemento de 30 ml de Origen Hybridoma Cloning Factor (IGEN, Gaithersburg, MD, Estados Unidos), HAT (1 vial, concentración recomendada por el fabricante, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) y 0,5 mg/ml de kanamicina (Life Technologies, Paisley, Escocia).

35 **Medio de Clonación de Fusión (FCM):**

40 FPM con un suplemento de 20 ml de Origen Hybridoma Cloning Factor (IGEN, Gaithersburg, MD, Estados Unidos), HT (1 vial, concentración recomendada por el fabricante, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) y 0.5 mg/ml de kanamicina (Life Technologies, Paisley, Escocia).

Preparación de hibridoma: fusión de células de bazo y ganglio linfático con células de mieloma SP2/0

Para obtener hibridomas, se retiraron el bazo, y los ganglios linfáticos inguinales y para-aórticos de los ratones. Se mezclaron suspensiones de células individuales del bazo y células de los ganglios linfáticos con células de mieloma SP2/0 a una razón celular de 1:2. Las células se centrifugaron y el sedimento se resuspendió suavemente en 1 ml de polietilenglicol (50% p/v en PBS, Sigma-Aldrich, Irvina, Reino Unido) a 37°C. Después de remover las células por medio de movimientos circulares durante 60 segundos, se añadieron 25 ml de FPM-2 y las células se incubaron a 37°C durante 30-60 minutos. Tras la incubación, las células se cultivaron a una concentración celular de $0,75 \times 10^5$ células por pocillo (en 100 μ l) en placas de 96 pocillos en FSM. Después de 3 días, se añadieron 100 μ l de FSM a cada pocillo.

La fusión de bazo y ganglios linfáticos de ratones HCo7 y HCo12 inmunizados con hIL-15 dio como resultado la generación de varios hibridomas que producían anticuerpos dirigidos contra IL-15. Se aislaron los siguientes cuatro clones estables que producían anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos: (1) 146LyD7F7B7 redenominado: 146B7; (2) 146DE2E12A3H5 redenominado: 146H5; (3) 404CG11B7E4 redenominado: 404E4; y (4) 404FB12E7A8 redenominado: 404A8. Estos clones fueron todos de la subclase IgG1/k humana.

Escrutinio de los hibridomas

Entre el día 7 y el 11 después de la fusión, se escrutaron los pocillos para determinar la presencia de anticuerpos humanos utilizando los siguientes ELISA:

ELISA para escrutar en busca de la presencia de IgG humana en los sobrenadantes de cultivo

Para realizar el ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgG humanos, se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpos de cadenas ligeras α -k de conejo de 0,9 μ g/ml de (DAKO, Glostrup, Dinamarca) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una placa de ELISA Nunc Maxisorp (incubación durante la noche a la temperatura ambiente). Después de bloquear la placa con PBS con un suplemento de suero de pollo (2%; Life Technologies, Paisley, Escocia) y Tween-20 (0,05%; PBSTC), se añadieron los sobrenadante de cultivo. Después de una incubación durante 1,5 horas las placas se lavaron y se añadió IgG de conejo- α -Humana (fragmentos Fab2) conjugada con peroxidasa de rábano picante (DAKO, Glostrup, Dinamarca) 0,5 μ g/ml diluida en PBSTC. Después de una incubación de 1 hora, los pocillos se lavaron y se añadió sustrato, ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-sulfónico, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se evaluó la unión de anticuerpo a 405 nm en un lector de ELISA EL808 (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

ELISA para escrutar la presencia de anticuerpos específicos para IL-15

Se sometieron adicionalmente a ensayo pocillos que contenían anticuerpos IgG/k humanos para detectar la presencia de anticuerpos anti IL-15 humanos en un ELISA específico para IL-15. Para realizar el ELISA, se añadieron 100 μ l/pocillo de 1 μ g/ml de IL-15 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la placa de ELISA Nunc Maxisorp (incubación durante la noche a la temperatura ambiente). Después de bloquear la placa con PBS con un suplemento de suero de pollo (2%; Life Technologies, Paisley, Escocia) y Tween-20 (0,05%; PBSTC), se añadieron los sobrenadantes de cultivo. Después de una incubación de 1,5 horas las placas se lavaron y se añadió Fc de IgG Humana α conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno research, West Grove, Pennsylvania, Estados Unidos) diluido 1/5000 en PBSTC. Tras una incubación de 1 hora, los pocillos se lavaron y se añadió sustrato, ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-sulfónico, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se evaluó la unión al anticuerpo a 405 nm en un lectro de ELISA EL808 (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

Subclonación de los hibridomas

Para obtener líneas celulares anti-IL-15 estables, se subclonaron los hibridomas mediante dilución limitante de las células (a 0,5 células/pocillo) en placas de 96 pocillos.

Los subclones se sometieron a ensayo después de aproximadamente 10 días con el ELISA para IL-15 mencionado más arriba. Durante los numerosos procedimientos de subclonación, se cambió el MSF en fases vía FCM a MCF. El isotipo de los subclones se determinó con el ELISA descrito más abajo.

Determinación del isotipo de los anticuerpos anti-IL-15 mediante ELISA

Para realizar el ELISA para los isotipos, se añadieron 100 μ l/pocillo de Fc anti-humano de 1 μ g/ml (Jackson Immuno Research) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una placa de ELISA Nunc Maxisorp (incubación durante la noche a la temperatura ambiente). Después de bloquear la placa con PBS con un suplemento de suero de pollo (2%; Life Technologies, Paisley, Escocia) y Tween-20 (0,05 %; PBSTC), se añadieron los sobrenadantes de cultivo. Después de una incubación de 1,5 horas, las placas se lavaron y se añadió HulgG1 α de ratón conjugada

con fosfatasa alcalina (Zymed, Plaats, Land), o HulgG3 α de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Zymed). Después de una incubación de 1 hora los pocillos se lavaron y se añadió el sustrato, ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-sulfónico, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La unión al anticuerpo se evaluó a 405 nm en un lector ELISA EL808 (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

Ejemplo 4 Especificidad de Epítipo de Anticuerpos Anti-IL-15 Completamente Humanos

Para que funcionen terapéuticamente y para que inhiban los efectos pro-inflamatorios inducidos por IL-15, es necesario que los anticuerpos específicos de IL-15 reconozcan los epítipos de IL-15 implicados en la interacción con la cadena IL-2R β y/o la cadena γ del receptor de IL-15.

Se utilizaron proteínas mutantes (descritas por Pettit *et al.*) para evaluar la especificidad de epítipo de los anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos, 146B7, 146H5, 404A8 y 404E4. Los mutantes de IL-15 utilizados incluyen el mutante de IL-15 Q108S (la Gln del residuo 108 fue remplazada por Ser; una mutación en el sitio de interacción de la cadena γ) y el mutante D8SQ108S (la Gln del residuo 108 fue remplazada por Ser y el Asp de la posición 8 fue sustituido por Ser; mutaciones en ambos sitios de interacción de las cadenas β y γ de IL-15).

ELISA para determinar la unión de los anticuerpos específicos para hIL-15, 146B7, 147H5, 404A8 y 404E4, para hIL-15 y para las proteínas IL-15 mutantes

Para realizar el ELISA, se añadieron 100 μ l de IL-15 o proteína mutante de hIL-15 de 1 μ g/ml, en solución salina tamponada con fosfato (PBS), a una placa de ELISA Nunc Maxisorp para el recubrimiento. Después de bloquear la placa con PBS con un suplemento de suero de pollo (2%; Life Technologies, Paisley, Escocia) y Tween-20 (0,05%; PBSTC), se incubaron diluciones seriadas de los anticuerpos específicos para hIL-15. Después de lavar, se añadió Fc de IgG Humana α conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno research, West Grove, Pennsylvania, Estados Unidos) diluido 1/5000 en PBSTC. Después de lavar se añadió el sustrato, ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-sulfónico, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se evaluó la unión del anticuerpo a 405 nm en un lector de ELISA EL808 (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

La unión de los anticuerpos específicos para IL-15 completamente humanos 146B7, 146H5, 404A8 y 404E4 para hIL-15 y para las proteínas mutantes de IL-15 Q108S y D8SQ108S se muestra en la Figura 1. Ni 146B7 ni 146H5 fueron capaces de unirse a estas proteínas mutantes de IL-15. Puesto que ambos mutantes portan la mutación Q108S, el epítipo reconocido por 146B7 y 146H5 está dentro de los dominios críticos de IL-15 que interaccionan con la cadena γ del receptor de IL-15. Tanto 404A8 como 404E4 fueron capaces de unirse a las proteínas mutantes, por lo tanto, estos anticuerpos reconocen un epítipo fuera de los dominios que interaccionan con la cadena β y la cadena γ de IL-15. Tanto 146B7 como 146H5 se unen a IL-15 en la región que interacciona con la cadena γ del receptor de IL-15. Esto concuerda con los datos obtenidos de los análisis de proliferación utilizando los anticuerpos anti-IL15 completamente humanos de la presente invención. Como se describe con detalle más abajo, ni 404A8 ni 404E4 fueron capaces de inhibir la proliferación de células CTLL-2 y de PBMC humanas inducida por IL-15. Tanto 146B7 como 146H5 fueron capaces de inhibir la proliferación inducida por IL-15. Adicionalmente, la inhibición de la proliferación se logra bloqueando la interacción de IL-15 con la subunidad γ del receptor de IL-15.

Ejemplo 5 Secuencias de la Región V_H y V_L de 146B7

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida de los dominios V_H y V_L reordenados de 146B7 se determinaron utilizando los siguientes procedimientos. Estas secuencias proporcionan información referente a las familias de la línea germinal V_H y V_L utilizadas: las mutaciones puntuales de estas secuencias de la línea germinal se deben a la maduración de afinidad de las células B durante la inmunización del animal.

Preparación del ARN

El ARN total se preparó a partir de 5 x 10⁶ células de hibridoma 146B7 con RNazol (Biogenesis, Poole, Inglaterra) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

Preparación de ADNc

Se preparó el ADNc del ARN de 146B7 a partir de 3 μ g de ARN total con Transcriptasa Inversa AMV con tampón (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), oligo d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), dNTP (Boehringer Mannheim corp., Estados Unidos) y RNAsin (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Cebadores de PCR utilizados para amplificar las regiones V_H y V_L para la clonación

Pares de cebadores utilizados:

V_H:		
	cebadores FR1 5'	
(1)	AB62	CAG gTK CAg CTg gTg CAg TC
(2)	AB63	SAG gTg CAg CTg KTg gAg TC
(3)	AB65	gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC
	cebadores líder V _H 5'	
(4)	AB85	ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC
(5)	AB86	ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg
(6)	AB87	ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg
(7)	AB88	ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC
(8)	AB89	ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT
	cebador V _H 3'	
(9)	AB90	TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg
	V_K:	
	cebadores FR1 5'	
(1)	AB8	RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC
(2)	AB9	gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC
(3)	AB10	gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC
(4)	AB11	gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC
(5)	AB 12	gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC
(6)	AB13	gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC
(7)	AB14	gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC
	cebadores líder V _K 5':	
(8)	AB123	CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg
(9)	AB124	CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC
(10)	AB125	CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC
(11)	AB126	ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC
	cebador 3' V _K	
(12)	AB16	Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

Condiciones de PCR utilizadas para amplificar las regiones y V_L para la clonación

- 10 Se realizaron las reacciones de PCR con polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer) sobre un GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Protocolo de ciclos de la PCR:	
	94° 2'
11 ciclos	94° 30"
	65° 30", menos 1° por ciclo
	72° 30"
30 ciclos	94° 30"
	55° 30"
	72° 30"
	72° 10'
	enfriar a 4°

Clonación de V_H y V_L en pGEMT - Vector System I

5 Después de analizar los productos de la PCR sobre un gel de agarosa, se purificaron los productos con columnas Microspin S-400 o S300 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, Estados Unidos), o el Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Para cada experimento se clonaron 2 productos de PCR amplificados independientemente, utilizando FR1 o cebadores líder, de cada región V_H y V_L en pGEMT - Vector System I (Promega) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

10 Después de la transformación en *E. coli* DH5 α , se escrutaron las colonias individuales mediante PCR de colonias utilizando cebadores de T7 y SP6, 30 ciclos a 55°. El ADN plasmídico de cada colonia individual se purificó utilizando el Kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen). Para analizar adicionalmente se realizó una digestión *NcoI/NotI* (NE Biolabs, United Kingdom and Roche Diagnostics) y se analizó sobre un gel de agarosa.

15 Secuenciación

Se secuenciaron las regiones V después de la clonación en el pGEMT-Vector System I. Se utilizaron cebadores de T7 y Sp6 (Eurogentec, Luik, Bélgica) combinados con el kit de secuenciación: ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo. Las reacciones se realizaron en un Secuenciador ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems) y las secuencias se analizaron con el programa DNASTar, SeqmanII. Después se alinearon las secuencias con las secuencias del gen V de la línea germinal en VBASE (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm).

25 Clonación y secuenciación de la región V_H y V_L de 146B7

Se amplificaron las regiones V_H y V_L del hibridoma 146B7 por medio de PCR y se clonaron en el pGEMT-Vector System I para determinar la secuencia del ADNc. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente se muestran en la Figura 2 (SEQ ID NO: 1 y 2) y en la Figura 3 (SEQ ID NO: 3 y 4), respectivamente. Las regiones marco (FR) y determinantes de la complementariedad (CDR) también están indicadas. La familia de la línea germinal para la región V_H de 146B7 de acuerdo con el alineamiento en Vbase: V_{H5-51} (subgrupo V_{H5}), D2-15/D2 (segmento D_H), JH4b (segmento J_H). La familia de la línea germinal para la región V_L de 146B7 de acuerdo con el alineamiento en Vbase: A27 (subgrupo V_{kIII}) y J_{k2} (segmento J_k). Se muestra más información referente a los dominios V_H y V_L en la base de datos de Kabat <http://immuno.bme.nwu.edu/> o en <http://www.Vbase.com>.

35 Ejemplo 6 Características de la unión por afinidad de 146B7

Se analizó la afinidad de 146B7 mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un aparato BIACORE 3000 para determinar las interacciones de las proteínas biomoleculares de acuerdo con los siguientes procedimientos. Los cambios en la señal de SPR sobre la capa superficial causados por la unión biomolecular se detectan e indican un cambio en la concentración de masa en la capa superficial. La afinidad se expresa utilizando las siguientes definiciones: k_a = constante de la velocidad de asociación ($M^{-1}seg^{-1}$); k_d = constante de la velocidad de disociación (seg^{-1}); K_A = constante de asociación en el equilibrio = k_a/k_d (M^{-1}); y K_D = constante de disociación en el equilibrio = k_d/k_a (M).

45 Se realizaron diferentes procedimientos para obtener la afinidad de 146B7 para la IL-15 humana (hIL-15). Se acopló IL-15 recombinante humana de dos proveedores diferentes (Immunex corp., Seattle, Estados Unidos y Peptotech, Rocky Hill, NJ, Estados Unidos) a un chip sensor CM5. El compuesto acoplado al chip sensor se define como ligando. En otros experimentos se utilizó 146B7 como ligando.

50

En cada análisis cinético, se comparó la unión del analito, 146B7 o hIL-15 adaptado al ligando acoplado al chip sensor, con la unión a un chip sensor CM5 de control de referencia. Se sometieron a ensayo diluciones seriadas de analito (0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/ml). Se ajustaron las curvas de asociación y disociación para la interacción en el modelo de Langmuir 1:1, para determinar k_a y k_d y para calcular K_A y K_D . Todos los datos se analizaron utilizando BIA-Evaluation Versión 3.1. Para una interacción bivalente se utilizó el modelo de "analito bivalente". Todos los análisis se corrigieron para una deriva de la línea base.

Para determinar la afinidad del anticuerpo 146B7, se midió la afinidad del anticuerpo para IL-15 humana recombinante obtenida de dos proveedores diferentes, Immunex y Peprotech, en el BIACORE 3000. Utilizando 146B7 como ligando y hIL-15 como analito, se determinó la interacción monovalente (ajuste de la curva Langmuir 1:1).

La afinidad de 146B7 para IL-15 (Immunex Corp.) se midió como sigue:

Constante de la velocidad de asociación k_a :	$1,07 (\pm 0,17) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
Constante de la velocidad de disociación k_d :	$6,56 (\pm 0,09) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$
Constante de asociación en el equilibrio K_A :	$1,55 (\pm 0,21) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Constante de disociación en el equilibrio K_D :	$6,59 (\pm 0,88) \times 10^{-8} \text{ M}$

Para determinar la avidéz de 146B7, se utilizó IL-15 (Immunex Corp.) como ligando y se utilizó 146B7 como analito. Cuando se analizaron los datos utilizando el ajuste de la curva de Langmuir (1:1) se expresó la interacción bivalente del anticuerpo, y se determinó la avidéz del anticuerpo.

La avidéz de 146B7 para IL-15 (Immunex Corp.) se midió como sigue:

Constante de velocidad de asociación k_a :	$7,30 (\pm 0,81) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
Constante de velocidad de disociación k_d :	$1,45 (\pm 2,05) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$
Constante de asociación en el equilibrio K_A :	$5,03 (\pm 3,40) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
Constante de disociación en el equilibrio K_D :	$1,55 (\pm 1,24) \times 10^{-9} \text{ M}$

También se determinó la afinidad y la avidéz de 146B7 para IL-15 de Peprotech. No se observaron diferencias importantes en la afinidad o avidéz para las dos fuentes diferentes de IL-15.

Como se describe en el ejemplo de más abajo referente a la inhibición de la proliferación de células CTLL-2 y PBMC inducida por interleuquina-15 humana (hIL-15) por anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos, 146B7 inhibía de una manera dependiente de la dosis la proliferación inducida por IL-15 medida mediante la incorporación de timidina- $[H^3]$. Se calculó la CI50 – concentración para una inhibición del 50%, una manera más funcional de determinar la afinidad – de estos experimentos de inhibición de la proliferación: $3,1 \pm 0,91 \text{ nM}$. Esta CI50 está de acuerdo con la avidéz medida mediante BIACORE 3000 (K_D 1,5 nM) utilizando 146B7 como ligando e IL-15 humana recombinante como analito y confirmó las medidas de afinidad y la avidéz obtenidas aquí.

Ejemplo 7 Inhibición de la producción de TNF- α inducida por hIL-15 por anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos

El efecto de los anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos, 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8, sobre la producción de TNF- α inducida por IL-15 se estudió utilizando células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos utilizando los procedimientos siguientes. Para evaluar la especificidad para IL-15, también se examinó el efecto de estos anticuerpos sobre la producción de TNF- α mediada por IL-2.

Cultivo celular

Los cultivos se mantuvieron en RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM, penicilina de 100 IU/ml, estreptomina de 100 IU/ml (todos derivadas de Life Technologies, Paisley, Scotland) y suero fetal de ternera inactivado con calor al 10% (HyClone, Utah, Estados Unidos).

Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se extrajo sangre humana fresca de un voluntario sano después de su consentimiento informado, se añadió heparina contra la coagulación. La purificación de PBMC se realizó por medio de centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll (Farmacia, Uppsala, Suecia).

Compuesto de Ensayo

HIL-15, lote núm: 6870-011, Immunex corp., Seattle, Washington, Estados Unidos.

hIL-2, Chiron Benelux BV, Amsterdam, Holanda.

5 Anticuerpos completamente humanos utilizados: 146B7 (lote: 070101) y 146B7RDJW07, 404A8 (lote: 030101) y 404E4 (lote: 080101) y como anticuerpo de control de isotipo T1 (97-2B 11-2B 12, lote: 190900).

Inhibición de la producción de TNF- α inducida por IL-15 humana (HIL-15) o hIL-2 por medio de PBMC mediante anticuerpos anti-IL-15

10 Se cultivaron PBMC por triplicado o cuadruplicado en placas de fondo plano de 96 pocillos a $1,5 \times 10^5$ células por pocillo en presencia o ausencia de HIL-2 o hIL-15 y con o sin anticuerpos anti-IL-15. El anticuerpo de control de isotipo (T1) se incluyó como control negativo. Se añadió concanavalina A (2,5 μ g/ml, Calbiochem) como control positivo para determinar la proliferación. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Los sobrenadantes se cosecharon para cuantificar la cantidad de TNF- α humano mediante ELISA (U-CyTech, Utrecht, Holanda).

20 Los efectos de 146B7 y un anticuerpo de control de isotipo se sometieron a ensayo sobre la producción de TNF- α mediada por IL-15 por medio de PBMC. 146B7 inhibió la producción de TNF- α mediada por HIL-15 de una manera dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo de control de isotipo no inhibió la producción de TNF- α inducida por hIL-15 (Figura 4). Se muestran los datos de dos voluntarios sanos. 404E4 y 404A8 fueron incapaces de inhibir la producción de TNF- α inducida por hIL-15.

25 Para asegurarse de la especificidad de los anticuerpos anti-IL-15, se evaluó su efecto sobre la producción de TNF- α mediada por hIL-2. No se indujo la inhibición de la producción de TNF- α mediada por IL-2 por medio de 146B7 (Figura 5). No se observó inhibición dependiente de la dosis ni por 404E4 ni por 404A8 en la producción de TNF- α mediada por hIL-2.

30 Solo se observó un inhibición dependiente de la dosis de la producción de TNF- α mediada por hIL-15 por medio de 146B7 y no por 404E4 ni 404A8. El efecto inhibitorio fue específico para hIL-15; la producción de TNF- α mediada por IL-2 no resultó inhibida.

Ejemplo 8 Inhibición de la proliferación de células CTLL-2 y PBMC inducida por interleuquina 15 humana (hIL-15) mediante anticuerpos anti-IL-15 completamente humanos

35 Los anticuerpos 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8 se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de células T utilizando células CTLL-2 (Gillis *et al.*, 1978) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando los procedimientos siguientes.

Cultivo celular

40 Los cultivos se mantuvieron en RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM, penicilina de 100 IU/ml, estreptomina de 100 IU/ml (derivados de Life Technologies, Paisley, Scotland) y suero fetal de ternera inactivado con calor al 10% (HyClone, Utah, Estados Unidos).

45 Las células CTLL-2 (Gillis *et al.*, 1978) se mantuvieron en el medio anteriormente mencionado con un suplemento de 36 unidades de hIL-2/ml (Chiron Benelux BV, Amsterdam, Holanda) y se les privó de hIL-2 durante 3-4 días antes del comienzo del experimento. Las células CTLL-2 se lavaron tres veces antes de su uso.

Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

50 Se extrajo sangre humana fresca de voluntarios sanos después de su consentimiento informado, se añadió heparina contra la coagulación. La purificación de PBMC se realizó por medio de centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Compuesto de Ensayo

HIL-15, lote núm: 6870-011, Immunex corp., Seattle, Washington, Estados Unidos.

hIL-2, Chiron Benelux BV, Amsterdam, Holanda.

60 los anticuerpos anti-IL-15 utilizados para el análisis con CTLL-2 en este informe se muestran en la Figura 8: 146B7, 146H5, 404A8, 404E4.

anticuerpos anti-IL-15 utilizados para los análisis con PBMC: 146B7 (lote: 070101), 404A8 (lote: 030101) y 404E4 (lote: 080101).

65

Inhibición de la proliferación de CTLL-2 inducida por IL-15 humana (hIL-15) o hIL-2 mediante anticuerpos anti-IL-15

5 En cada experimento, las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos, 5×10^3 células por pocillo en presencia o ausencia de hIL-2 o hIL-15. Para evaluar el efecto sobre la proliferación, se añadieron cada uno de los cuatro anticuerpos anti-IL-15. Las células se incubaron durante 16 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Se añadió timidina[³H] (1 µCi/pocillo, Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 4 horas antes de la recolección (Harvester 96 Mach II M, Tomtec, Orange CT, Estados Unidos).

10 Como se muestra en la Figura 6, la proliferación de células CTLL-2 inducida por IL-15 disminuyó de una manera dependiente de la dosis por medio de 146B7 y 146H5 según se reflejó mediante la reducción de la incorporación de timidina[³H]. Ni 404E4 ni 404A8 fueron capaces de bloquear la proliferación de células CTLL-2 inducida por IL-15.

Inhibición de la proliferación de PBMC inducida por hIL-15 (hIL-15) o hIL-2 por medio de anticuerpos anti-IL-15

15 Las PBMC se cultivaron por triplicado en placas con fondo en forma de U de 96 pocillos (Nunc, Nalge Nunc International, Dinamarca), 5×10^4 células por pocillo en presencia o ausencia de hIL-2 o hIL-15 y anticuerpos anti-IL-15. Se añadió concanavalina A (2,5 µg/ml, Calbiochem) como control positivo para la proliferación. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Se añadió timidina[³H] (1 µCi/pocillo, Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 16 horas antes de la recolección (Harvester 96, Tomtec, Orange CT, Estados Unidos).

20 146B7 fue capaz de inhibir la incorporación de Timidina[³H] inducida por IL-15 dependiente de la dosis y, por lo tanto, inhibió la proliferación (CI₅₀ = $3,1 \pm 0,91$ nM). Tanto 404E4 como 404A8 fueron incapaces de bloquear la proliferación de PBMC inducida por hIL-15. 146H5 no se sometió a ensayo de acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos realizados previamente. Para asegurarse de la especificidad de 146B7, 404E4 y 404A8 para IL-15, también se evaluaron los efectos de estos anticuerpos sobre la proliferación mediada por IL-2. Ninguno de los anticuerpos anti-IL-15 sometidos a ensayo exhibió ningún efecto sobre la proliferación inducida por IL-2 (Figuras 7-9).

Ejemplo 9 El anticuerpo 146B7 anti-IL-15 se une a IL-15 humana presente en PBMC humanas**Compuestos de ensayo**

35 Las PBMC humanas se obtuvieron de voluntarios sanos después de su consentimiento informado. Anticuerpo 146B7 (lote núm. MDX015), Medarex Inc., Milpitas, CA, Estados Unidos.

Biotinilación de 146B7 e IgG humana

40 En primer lugar se diluyó N-hidroxisuccinimido-biotina (Sigma) en DMSO (dilución final: 100 mg/ml) y a continuación en NaHCO₃ 0,1 M (dilución final: 1 mg/ml, Sigma). Por 1 mg de anticuerpo (diluido en 1 ml), se añadieron 600 µl de solución de biotina (color oscuro, 2 hrs, RT). La solución de anticuerpo-biotina se sometió a diálisis una casete de diálisis slide-a-lyzer™ (10.000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Holanda) (durante la noche a 4°C) para eliminar la biotina no marcada. El día siguiente, se determinó la concentración de anticuerpos biotinilados por medio de espectrofotometría (Ultrospec 2100pro) a DO 280 nm.

Estimulación de sangre periférica

50 Para inducir la IL-15, la sangre se obtuvo por medio de punción en la vena de voluntarios sanos. Las PBMC se cultivaron en RPMI 1640 (Biowhittaker Europe) con un suplemento de penicilina (5 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), L-glutamina (2 mM) (Biowhittaker Europe), y suero fetal de ternera al 10% (Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.) durante un máximo de 2 días (37°C), y se estimularon con IFN γ de 500 U/ml (Boehringer Ingelheim).

Citometría de flujo

55 Las células se pre-incubaron con suero AB humano al 10% (CLB, Amsterdam, Netherlands) en RPMI 1640 (Biowhittaker Europe) con un suplemento de penicilina (5 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), L-glutamina (2 mM) (Biowhittaker Europe) y suero fetal de ternera al 10% (Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.). Después de la permeabilización (20 min, 4°C, en un kit Cytofix/Cytoperm™, Becton Dickinson, San Diego, CA) y el lavado en tampón Perm/Wash™ (Kit Cytofix/Cytoperm™), las PBMC se sometieron a tinción de la IL-15 por medio de citometría de flujo. La permeabilidad continua se alcanzó utilizando tampón Perm/Wash™ (Kit Cytofix/Cytoperm™) en todo el procedimiento de tinción. Después de incubación las células con 146B7 biotinilado o con hlgG1 biotinilada (20 µg/ml, 30 min, 4°C) y lavado en tampón Perm/Wash™, las células se incubaron con posterioridad con estreptavidina-ficoeritina (DAKO) durante 30 minutos (4°C). Se determinó la intensidad de fluorescencia de al menos 5000 células por muestra después del análisis por medio de citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson) y acotamiento de los

monocitos, utilizando soporte lógico CellQuest Pro. Los datos muestran el índice de estimulación (I.E.), que se calcula como sigue: I.E. = (tinción positiva con fluorescencia media)/(tinción del fondo con fluorescencia media)

Inmunocitoquímica

5 Para detectar la IL-15 presente en los monocitos humanos, se realizaron preparaciones de Cytospin de muestras de sangre completa. Después de centrifugar 5×10^4 células (200 μ l) sobre portas de microscopio Superfrost®-Plus (Menzel), los portas se secaron al aire (< 60 min), se fijaron en paraformaldehído al 2%/PBS (8 min, 4°C), se lavaron con PBS y se secaron al aire de nuevo. Antes de la tinción, las preparaciones de Cytospin se permeabilizaron en PBS (+saponina 0,1%; PBSS), que con posterioridad se utilizó a lo largo del procedimiento de tinción. Para bloquear la actividad peroxidasa endógena, las preparaciones de Cytospin se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0,05% (v/v) (H_2O_2) diluido en ácido cítrico/tampón fosfato (pH 5,8, 20 min, RT). Después de lavar con PBSS, la actividad biotina endógena se bloqueó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biotin Blocking Kit, Vector Lab., DAKO). Después de lavar con PBSS, los sitios de unión no específicos se bloquearon por medio de incubación de las preparaciones de Cytospin con mezclas de suero AB humano al 10% (v/v) (CLB, Amsterdam, Netherlands) (30 min) en PBSS. Después de eso, las preparaciones de Cytospin se incubaron con anticuerpo primario biotinilado (60 min, RT) y, después de lavar con PBSS, con estreptavidina formando complejo con peroxidasa de rábano picante biotinilada (streptABComplex/HRP, DAKO; 1:100 en PBSS, que contenía suero AB humano al 2%; 30 min, RT). Después de lavar en PBSS, las preparaciones de Cytospin se incubaron con 3-amino-9-etilcarbazol (0,5 mg/ml) y H_2O_2 (0,01%), en tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 4,9) durante 10 minutos (RT), para la detección de la actividad HRP. Las Cytospin se lavaron con agua corriente del grifo durante 5 minutos, se contratificaron con hematoxilina (DAKO) durante un minuto, se lavaron con agua corriente del grifo durante otros 5 minutos, y se embebieron en Faramount o Glycergel (DAKO).

Citometría de flujo

La unión de 146B7 a monocitos humanos estimulados con IFN γ se muestra en la Figura 10. El 146B7 biotinilado se une a monocitos no estimulados que muestran la presencia de IL-15 en células no estimuladas. La estimulación de monocitos con IFN γ conduce a un incremento de la unión de 146B7 a las células, alcanzándose un máximo el primer día de cultivo. El anticuerpo de control, hlgG1, muestra poca unión a los monocitos no estimulados. La estimulación con IFN γ incrementa la unión de hlgG1 a través del aumento de expresión de los receptores de Fc γ sobre los monocitos.

Inmunocitoquímica

La Figura 11 muestra la tinción de monocitos humanos con 146B7, o con el anticuerpo de control, hlgG1. Se observa una tinción del citoplasma de color rojo claro después de incubar las células con 146B7, pero no con el anticuerpo de control. Por consiguiente, 146B7 se une a hIL-15 en monocitos y esta unión es regulada al alza después de la estimulación con IFN γ . La Figura 11 también muestra que la tinción de IL-15 es principalmente intracelular.

Ejemplo 10 El anticuerpo 146B7 anti-IL-15 humana se une a IL-15 en tejidos por medio de inmunohistoquímica

Compuestos de ensayo

Las muestras de tejido cutáneo psoriásico humano se obtuvieron después de su consentimiento informado. Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Copenhagen, Denmark.

Anticuerpo 146B7 (lote núm. MDX015), Medarex, Milpitas, CA, Estados Unidos

Biotinilación de 146B7 e IgG humana

En primer lugar se diluyó N-hidroxisuccinimido-biotina (Sigma) en DMSO (dilución final: 100 mg/ml) y a continuación en NaHCO $_3$ 0,1 M (dilución final: 1 mg/ml, Sigma). Por 1 mg de anticuerpo (diluido en 1 ml), se añadieron 600 μ l de solución de biotina (color oscuro, 2 hrs, RT). La solución de anticuerpo-biotina se sometió a diálisis en una casete de diálisis slide-a-lyzer™ (10.000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Netherlands) (ON, 4°C) para eliminar la biotina no marcada. El día siguiente, se determinó la concentración de anticuerpos biotinilados por medio de espectrofotometría (Ultraspec 2100pro) a DO 280 nm.

Inmunohistoquímica

Los tejidos se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Después de descongelar, se fijaron secciones de tejido en acetona (10 min, RT) y se secaron cono aire. Para bloquear la actividad peroxidasa endógena, la secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,05% (v/v) diluido en ácido cítrico/tampón de fosfato (pH 5,8, 20 min, RT). Después de lavar con PBS-Tween 20 (PBST, 0,05% v/v), la actividad biotina endógena se bloqueó de acuerdo

con las instrucciones del fabricante (Biotin Blocking Kit, Vector Lab., DAKO). Después de lavar con PBST, los sitios de unión no específica se bloquearon incubando las secciones de tejido con mezclas de suero AB humano al 10% (v/v) (CLB, Amsterdam, Netherlands) (30 min) en PBST. El suero se retiró mediante secado y las secciones se incubaron con posterioridad con anticuerpo primario biotinilado (146B7 o hlgG1) diluido en PBS que contenía suero AB humano al 2 durante 60 minutos (RT). Las secciones se lavaron en PBST. Después de lavar en PBST, todas las secciones de tejido se incubaron con streptABComplex/HRP (DAKO; diluido 1:100 en PBS que contenía suero AB humano al 2%; 30 min, RT). Después de lavar en PBST, las secciones se incubaron con 3-amino-9-etilcarbazol (0,5 mg/ml) y H₂O₂ (0,01%), en tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 4,9) durante 10 minutos (RT), para la detección de la actividad HRP. Las secciones se lavaron con agua del grifo corriente durante 5 minutos, se contratiñeron con hematoxilina (DAKO) durante un minuto, se lavaron con agua del grifo corriente durante otros 5 minutos, y finalmente se embebieron en Faramount o Glycergel (DAKO).

Resultados

Se observó una tinción citoplásmica clara de queratinocitos en piel psoriásica después de teñir las secciones de tejido con 146B7, pero no con el anticuerpo de control (Figura 12; 146B7 tiñe queratinocitos positivos a IL-15 obtenidos de placas psoriásicas).

Ejemplo 11 El anticuerpo 146B7 anti-IL-15 humana bloquea IL-15 en quimeras de ratón SCID - tejido humano: inhibición significativa de la inflamación tanto en tejido artrítico como psoriásico

Compuestos de ensayo

Tejido sinovial – obtenido de pacientes con artritis reumatoide juvenil, después de su consentimiento informado; Alexei Grom, división de reumatología pediátrica, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos.

Biopsias de queratoma – las muestras de tejido se obtuvieron después de su consentimiento informado. Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Copenhagen, Dinamarca.

Anticuerpo 146B7 (lote núm. MDX015), Medarex Inc., Milpitas, CA, Estados Unidos para los experimentos de psoriasis.

Anticuerpo 146B7 (lote núm. 15-00RDJW07), Medarex Inc., Milpitas, CA, Estados Unidos para los experimentos de artritis reumatoide.

Bloqueo de IL-15 en quimeras de ratón SCID - tejido sinovial humano

Las muestras de tejido sinovial de nueva aportación se obtuvieron de pacientes con artritis reumatoide juvenil después de la cirugía de sustitución articular. Las muestras se recogieron con condiciones estériles. Fragmentos de tejido desmenuzados de las muestras de tejido sinovial completas se mezclaron cuidadosamente para asegurarse de la homogeneidad de cada preparación. Los tejidos desmenuzados (2-4 injertos por animal; 100 mg por sitio) se injertaron subcutáneamente en el dorso de ratones SCID/NOD (Jackson Laboratories). Cada animal recibió 146B7 (500 µg, i.p.) o PBS el día de la implantación del injerto, y durante los días 7, 14, y 21 de post-implantación. Los animales se sacrificaron el día 28 post-implantación. Los tejidos sinoviales se extirparon y se colocaron en formalina para la tinción HyE.

Cuantificación de la tinción HyE de tejidos de quimeras de ratón SCID - tejido sinovial humano (Modificado a partir de Lehr *et al.* J. Histochem. Cytochem. 1997, 45, 1559)

Después de obtener las imágenes digitales (2600x2060, jpg) de las secciones obtenidas a partir de quimeras de ratón SCID - tejido sinovial humano utilizando un objetivo X10 (microscopio Zeiss; soporte lógico Axiovision), los datos se analizaron mediante ordenador, por medio del uso de Photoshop, versión 6.0 (Adobe Systems, Mountain view, CA) y se redujeron a 1300x1300 píxeles. Dentro de cada sección se eligieron seis campos X10 con el fin de reflejar mejor la tinción global del tejido sobre el porta completo. Después de la selección de todos los núcleos teñidos (varita mágica sobre el núcleo de color oscuro con tolerancia 10), se generó una trama de densidad óptica de la zona seleccionada y se registró la intensidad de tinción media (después de la selección del comando histograma similar/imagen). Con posterioridad, se seleccionó el fondo y se cuantificó la tinción (varita mágica sobre el fondo con tolerancia 10). La intensidad de tinción se calculó como la diferencia entre la tinción nuclear y la tinción del fondo. Esto se denominó índice citoquímico con unidades arbitrarias. Los datos se muestran como la media y e.t.m. Los datos se analizaron por medio de la prueba t de Student.

Bloqueo de IL-15 en quimeras de ratón SCID - tejido psoriásico humano

Las biopsias de queratoma se obtuvieron de placas psoriásicas de dos pacientes, se dividieron y se trasplantaron a ratones C.B-17 SCID (Jackson Laboratories). Tres semanas después del trasplante los ratones recibieron PBS

(placebo), CsA (ciclosporin A) (Sandoz) a una dosis de 10 mg/kg un día si y otro no durante 15 días, o 146B7 a una dosis de 20 mg/kg el día 1 y 10 mg/kg los días 8 y 15. Una semana después de la última inyección, los ratones se sacrificaron, y se tomó un biopsia por punción de 4 mm de cada xenoinjerto. Las biopsias se fijaron en formalina para su imbibición con parafina y se tiñeron en HyE y para el antígeno nuclear Ki-67.

5 **Cuantificación de la tinción inmunohistoquímica de tejidos de quimeras de ratón SCID - tejido psoriásico humano**

10 Las secciones teñidas con HyE se evaluaron para determinar el grosor epidérmico (μm), el grado de paraqueratosis (puntuado de 0-3), y el número de células mononucleares inflamatorias en la epidermis. Las secciones teñidas para Ki-67 se evaluaron para determinar el número de queratinocitos en ciclo/ mm^2 de sección. Se calcularon los valores medio para los 4 ratones en cada grupo de tratamiento, y los datos de cada paciente se resumieron como la media y e.t.m.

15 **Modelo SCID/AR**

20 La observación microscópica de las secciones mostró que los núcleos teñidos más oscuros pertenecieron a las células infiltrantes. Por lo tanto, el número de núcleos (medido como el área de superficie relativa) se considera como una medida de la infiltración. La inyección de 146B7 reduce el número de células infiltrantes en el tejido sinovial inflamado, en comparación con el tratamiento con vehículo (Figura 13a, $p < 0,05$). La Figura 13b ilustra los efectos de 146B7 sobre la infiltración de células en tejido sinovial injertado, y muestra una reducción del número de células con núcleos oscuros, en comparación con el tratamiento con vehículo.

25 **Modelo SCID/psoriasis**

30 La Figura 14 muestra los ratones SCID/psoriasis con 146B7 o con tratamiento de control. En comparación con el vehículo, PBS, las inyecciones de 146B7 redujeron la gravedad de la psoriasis evaluada por medio del grosor de la epidermis cuando se midió a partir del estrato córneo hasta el principio de las crestas epidérmicas (Figura 14A): PBS ($177,8 \pm 42,2 \mu\text{m}$), CsA ($91,0 \pm 15,2 \mu\text{m}$), 146B7 ($62,5 \pm 9,1 \mu\text{m}$). También se observó una reducción del grosor cuando se midió a partir del estrato córneo hasta la parte más profunda de las crestas epidérmicas (Figura 14B): PBS ($433,8 \pm 32,1 \mu\text{m}$), CsA ($303,8 \pm 62,9 \mu\text{m}$) y 146B7 ($208,0 \pm 33,8 \mu\text{m}$). Asimismo, el grado de paraqueratosis se redujo por medio de tratamiento con 146B7 (Figura 14C): PBS ($1,6 \pm 0,4$), CsA ($1,3 \pm 0,3$), 146B7 ($0,5 \pm 0,3$). Además, 146B7 reduce el número de células mononucleares inflamatorias en la epidermis (Figura 14D): PBS ($33,3 \pm 1,9$ células mononucleares), CsA ($19,4 \pm 8,5$), 146B7 ($16,4 \pm 0,1$). La expresión de la proteína Ki-67 humana se asocia estrictamente a la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayoría de la proteína se relocaliza hacia la superficie de los cromosomas. El hecho de que la proteína Ki-67 esté presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G(1), S, G(2), y mitosis), pero esté ausente de las células en reposo (G(0)), la convierten en un marcador excelente para la determinación de la denominada fracción de crecimiento de una población dada de células. 146B7 reduce el número de queratinocitos en ciclo Ki-67+ (Figura 14E): PBS ($247,9 \pm 77,0$), CsA ($116,0 \pm 24,1$), 146B7 ($73,8 \pm 9,9$).

45 El tratamiento con 146B7 inhibió la infiltración de células inflamatorias en el tejido inflamado en modelos SCID humanos para artritis reumatoide. Además, en ratones SCID con placas psoriásicas humanas injertadas, el tratamiento con 146B7 redujo la gravedad de la psoriasis, en comparación con el tratamiento con CsA. Por supuesto, el tratamiento con 146B7 dio como resultado una mayor reducción de la inflamación, del grosor epidérmico, del número de queratinocitos en división, y de la gravedad de la paraqueratosis en ratones humano/SCID.

50 **Ejemplo 12 El anticuerpo 146B7 anti-IL-15 humana reconoce IL-15 unida al receptor**

Compuestos de ensayo

hlgG1 - anticuerpo humano de control (Sigma).

Anticuerpo 146B7 - Medarex Inc., MDX015.

55 Células Raji con expresión constitutiva de IL-15R α (Martin Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, U.K.).

Biotinilación de 146B7 e IgG humana

60 En primer lugar se diluyó N-hidroxisuccinimido-biotina (Sigma) en DMSO (dilución final: 100 mg/ml) y a continuación en NaHCO_3 0,1 M (dilución final: 1 mg/ml, Sigma). Por 1 mg de anticuerpo (diluido en 1 ml), se añadieron 600 μl de solución de biotina (color oscuro, 2 hrs, RT). La solución de anticuerpo-biotina se sometió a diálisis en una casete de diálisis slide-a-lyzer™ (10.000 MWCO, Pierce, Perbio Science, Netherlands) (durante la noche a 4°C) par eliminar la biotina no marcada. El día siguiente, se determinó la concentración de anticuerpos biotinilados por medio de espectrofotometría (Ultraspec 2100pro) a DO 280 nm.

Unión de 146B7 al complejo de IL-15 - IL-15R α mediante ELISA

Después de recubrir (durante la noche a temperatura ambiente) placas de microtitulación de fondo plano (Greiner) con IL-15R α (RyD systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), las placas se incubaron con PBS y suero de pollo (2%, RT, 60 min). Después de lavar en PBS (+Tween 20 al 0,05%: PBST), las placas se incubaron con posterioridad con varias diluciones de IL-15 no marcada (50 μ l, RT, Immunex, Seattle, Estados Unidos). Al cabo de 10 minutos, se añadieron anticuerpos biotinilados a los pocillos (50 μ l) a diferentes concentraciones (90 minutos a temperatura ambiente). Después de lavar en PBST, las placas se incubaron (60 minutos a temperatura ambiente) con estreptavidina-poli-peroxidasa de rábano picante (CLB, Amsterdam, Netherlands) diluido 1:10.000 en PBST-C (PBST y suero de pollo al 2%). Finalmente, las placas se lavaron y se incubaron con posterioridad con ABTS (Ácido azinobis-3-etilbenzotiazolin-sulfónico, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en tampón ABTS de acuerdo con el protocolo del fabricante. La reacción de coloración de detuvo con ácido oxálico al 2% (50 μ l). La unión se evaluó a 405 nm en un lector de ELISA EL808 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

Unión de 146B7 al complejo de IL-15 - IL-15R en células Raji

Las células Raji se pre-incubaron (20 minutos a 4°C) con mezclas de sueros AB humanos al 10% (CLB, Amsterdam, Netherlands) en tampón FACS (PBS, BSA al 0,05%, NaNO₃ al 0,02%). Las células Raji (1-2*10⁵ células/ml) se colocaron en los pocillos, y se añadieron 50 μ l de IL-15 no marcada a varias concentraciones (diluida en tampón FACS con suero AB humano al 10%). Después de incubar las células durante 30 minutos (4°C) y lavar dos veces en tampón FACS, se añadieron 50 μ l de anticuerpos biotinilados (146B7 o hlgG1) a los pocillos (30 minutos a 4°C). Después de lavar dos veces en tampón FACS, se añadieron 50 μ l de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo (30 minutos a 4°C). Después de lavar dos veces en tampón FACS, las células se recogieron en 200 μ l de tampón FACS, y se determinó una intensidad de fluorescencia de al menos 5000 células por muestra después del análisis por medio de citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson) utilizando soporte lógico CellQuest. Los datos muestran en índice de estimulación (I.E.), que se calcula como sigue:

I.E. = (tinción positiva con fluorescencia media)/(tinción del fondo con fluorescencia media)

ELISA

La unión de 146B7 al complejo de IL-15/IL-15R en el ELISA se muestra en la Figura 17. La unión de 146B7 aumenta con concentraciones crecientes de unión de IL-15 a su receptor. No se observaron efectos de unión del anticuerpo de control a IL-15 o a IL-15R.

Unión a células Raji que expresan IL-15R

La unión de 146B7 al complejo IL-15/IL-15R sobre células Raji se muestra en la Figura 18. 146B7 se une al complejo de IL-15/IL-15R de una manera dependiente de la dosis. No se observó unión de hlgG1 al complejo de IL-15/IL-15R sobre células Raji (Figura 18).

146B7 es capaz de unirse a IL-15 después de la unión de esta citoquina a su receptor. 146B7 se une a un epítipo de IL-15 que no está implicado en la unión al receptor.

Referencias

- Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Genovese M. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J. and Finck B. K. (2000) A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343, 1586-93.
- Fehniger T.A. and Caligiuri M.A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97: 14-28.
- Fishwild D.M., O'Donnell S.L., Bengoechea T., Hudson D.V., Harding F., Bernhard S.L., Jones D., Kay R.M., Higgins K.M., Schramm S.R. and Lonberg N. (1996) High-avidity human IgGk monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature biotechn.* 14: 845-51.
- Gillis S., Ferm M. M., Ou W. and Smith K. A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120, 2027-32.
- Kennedy M.K., et al. (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in IL-15 deficient mice. *J. Exp. Med.* 191: 771-80
- Kirman I., Vainer B. and Nielsen O. H. (1998) Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Res* 47, 285-9.
- Klippel J. H. (2000) Biologic therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343, 1640-1.
- Köhler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7.
- Liu C. C., Perussia B. and Young J. D. (2000) The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today* 21, 113-6.

5 Lovell D. J., Giannini E. H., Reiff A., Cawkwell G. D., Silverman E. D., Nocton J. J., Stein L. D., Gedalia A., Ilowite N. T., Wallace C. A., Whitmore J. and Finck B. K. (2000) Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med 342, 763-9.

5 Maini R N. and Taylor P. C. (2000) Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. Annu Rev Med 51, 207-29.

5 McInnes I. B., al-Mughales J., Field M., Leung B. P., Huang F. P., Dixon R., Sturrock R. D., Wilkinson P. C. and Liew F. Y. (1996) The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med 2, 175-82.

10 McInnes I. B., Leung B. P., Sturrock R. D., Field M. and Liew F. Y. (1997) Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. Nat Med 3, 189-95.

10 McInnes I. B. and Liew F. Y. (1998) Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. Immunol Today 19, 75-9.

15 Oppenheimer-Marks, et al. (1997) J. Clin. Investig. 101:1261-72. Pettit D. K., Bonnert T. P., Eisenman J., Srinivasan S., Paxton R., Beers C., Lynch D., Miller B., Yost J., Grabstein K. H. and Gombotz W. R. (1997) Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. J Biol Chem 272, 2312-8.

15 Ruchatz, et al. (1998) J. Immunol. 160:5654-60.

20 Waldmann T., Tagaya Y. and Bamford R. (1998) Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. Int Rev Immunol 16, 205-26.

20 Waldmann T. A., Dubois S. and Tagaya Y. (2001) Contrasting Roles of IL-2 and IL-15 in the Life and Death of Lymphocytes. Implications for Immunotherapy. Immunity 14,105-110.

25 Waldmann T. A. and Tagaya Y. (1999) The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annu Rev Immunol 17, 19-49.

Equivalentes

30 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de discernir utilizando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones. Se contempla que cualquier combinación de las realizaciones descritas en las reivindicaciones dependientes se encuentra dentro del alcance de la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GenMab, Inc. et al.
 <120> ANTICUERPOS HUMANOS ESPECÍFICOS PARA INTERLEUQUINA 15 (IL-15)
 5 <130> GMI-024PC
 <150> US 60/314,731 <151> 2001-08-23
 <160> 4
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 10 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)...(390)
 <400> 1

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1                               5                               10                               15

tct ctg aag atc tcc tgt aag gtt tct gga tac ttc ttt acc acc tac 96
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Phe Phe Thr Thr Tyr
                               20                               25                               30

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tat atg 144
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
                               35                               40                               45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50                               55                               60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65                               70                               75                               80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                               85                               90                               95

gcg aga ggg ggt aac tgg aac tgc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336
Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                               100                              105                              110

ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc 384
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
                               115                              120                              125

ctg gca 390
Leu Ala
 130
    
```

20 <210> 2
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 375 271 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Phe Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala
 130

<210> 3
 <211> 357
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(357)
 <400> 3

10
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 atc tat ggt gca tcc cgc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
 Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cgg tat ggt agc tca cac 288
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His
 85 90 95
 act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc agc cga act gtg gct gca 336
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 cca tct gtc ttc atc ttc ccg 357
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115

15 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que:
 - 5 (a) se une a IL-15 humana;
 - (b) inhibe los efectos proinflamatorios inducidos por IL-15; y
 - (c) comprende una región variable de la cadena pesada humana que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de la cadena ligera humana que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, donde:
 - 10 (i) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 100-107 del SEQ ID NO:2; y la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 90-97 del SEQ ID NO: 4;
 - 15 (ii) la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 50-66 del SEQ ID NO: 2 y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 51-57 del SEQ ID NO: 4; y
 - (iii) la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada humana comprende los residuos de aminoácido 31-35 del SEQ ID NO: 2 y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera humana comprende los residuos de aminoácido 24-35 del SEQ ID NO: 4.
- 20 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que
 - (a) inhibe la producción de TNF α ;
 - (b) inhibe la proliferación de células T;
 - 25 (c) inhibe la proliferación de queratinocitos; y
 - (d) inhibe la quimiotaxis de los leucocitos activados.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que no se une a los mutantes Q108S y D8SQ108S de IL-15.
- 30 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una región variable de la cadena pesada humana y una región variable de la cadena ligera humana, donde las regiones variables de la cadena pesada humana y de la cadena ligera humana comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en el SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.
- 35 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se selecciona entre un anticuerpo IgG1, un IgG2, un IgG3, un IgG4, un IgM, un IgA1, un IgA2, un IgAsec, un IgD y un IgE.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una cadena pesada de IgG1 y un cadena kappa ligera.
- 40 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores producido por medio de un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada o por medio de un transfectoma que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana.
- 45 9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una porción de unión al antígeno del anticuerpo.
10. Un método *in vitro* para inhibir la producción de TNF α inducida por IL-15, pero no inducida por IL-2, en células T o monocitos, que comprende poner en contacto IL-15 con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 55 11. Un método *in vitro* para inhibir la producción de células T inducida por IL-15, pero no inducida por IL-2, que comprende poner en contacto IL-15 con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, donde las células T son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células CTLL-2.
- 65 13. Un hibridoma que comprende una célula B obtenida de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera, fusionados a una célula inmortalizada, donde el hibridoma produce el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

14. Un transfectoma que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, donde el transfectoma produce una cantidad detectable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 5 15. El transfectoma de la reivindicación 14, donde los ácidos nucleicos comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en el SEQ ID NO: 1 y el SEQ ID NO: 3, o modificaciones conservativas de las mismas.
16. Un animal no humano transgénico que expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el animal no humano transgénico tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana.
- 10
17. Un método para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:
- 15 fusionar las células B aisladas de un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana y que ha sido inmunizado con IL-15 humana o una célula que expresa IL-15 humana, de manera que los anticuerpos son producidos por las células B del animal con células de mieloma para formar células de hibridoma, inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanos específicos para IL-15; y
- 20 aislar los anticuerpos monoclonales humanos específicos para IL-15 a partir del sobrenadante de cultivo del hibridoma.
18. Un producto inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un agente terapéutico.
- 25 19. El producto inmunoconjugado de la reivindicación 18, donde el agente terapéutico es un agente inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente antiinflamatorio seleccionado entre un agente antiinflamatorio esteroideo, un agente antiinflamatorio no esteroideo y un FARME.
- 30 20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
21. La composición de la reivindicación 20 que comprende adicionalmente un agente terapéutico.
- 35 22. La composición de la reivindicación 21, donde el agente es un agente inmunosupresor, un anticuerpo, un agente para tratar la psoriasis, un agente antiinflamatorio seleccionado entre un agente antiinflamatorio esteroideo y un agente antiinflamatorio no esteroideo, un FARME seleccionado entre metotrexato, etanercept y infliximab o un agente quimioterapéutico seleccionado entre doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida y clorambucil.
- 40 23. La composición de la reivindicación 22, donde el agente inmunosupresor es la ciclosporina.
24. La composición de la reivindicación 22, donde el anticuerpo es un anticuerpo específico de CD4 o un anticuerpo específico de IL-2.
- 45 25. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano por medio de terapia.
26. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno seleccionado entre la psoriasis, la artritis, las enfermedades inflamatorias intestinales, el cáncer, el rechazo de trasplantes y las enfermedades infecciosas.
- 50 27. El uso de la reivindicación 26, donde la artritis es la artritis reumatoide.
28. El uso de la reivindicación 26 o 27, donde el tratamiento o la prevención comprenden adicionalmente la administración simultánea de otro agente terapéutico.
- 55 29. El uso de la reivindicación 28, donde el agente terapéutico se define como en una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.
- 60 30. Un método para diagnosticar una enfermedad mediada por IL-15 por medio de la detección de la presencia del antígeno IL-15, o una célula que expresa IL-15, en una muestra que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo e IL-15 y detectar la formación de un complejo, donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de IL-15 en la muestra.
- 65

31. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

5 32. El ácido nucleico de la reivindicación 31 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 1, el SEQ ID NO: 3 y modificaciones conservativas de la misma.

10 33. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de una cadena ligera, una cadena pesada, o de ambas cadenas ligera y pesada, del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera comprende el SEQ ID NO:3 y la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada comprende el SEQ ID NO: 1.

34. Un transfectoma que comprende el vector de expresión de la reivindicación 33.

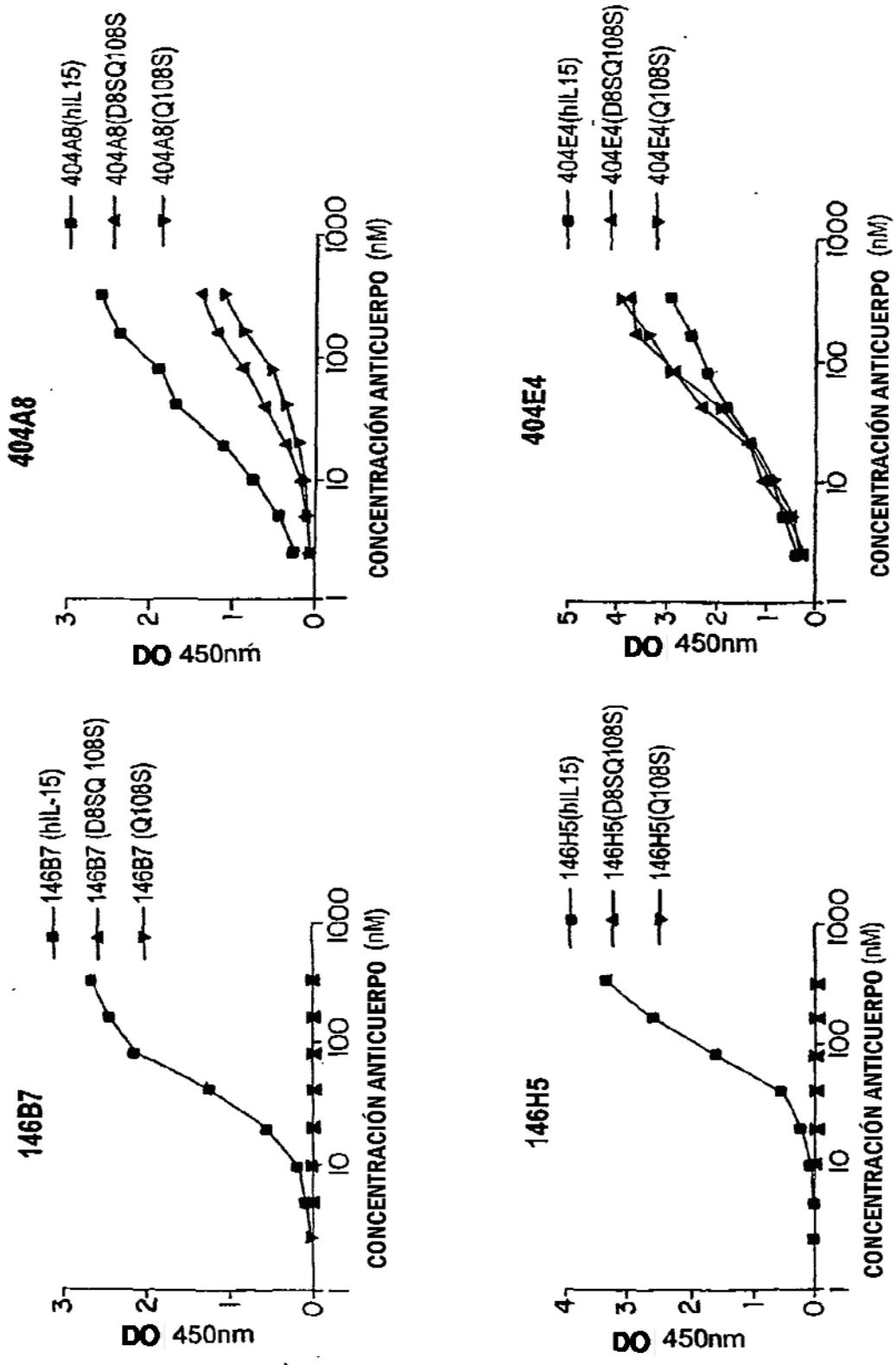
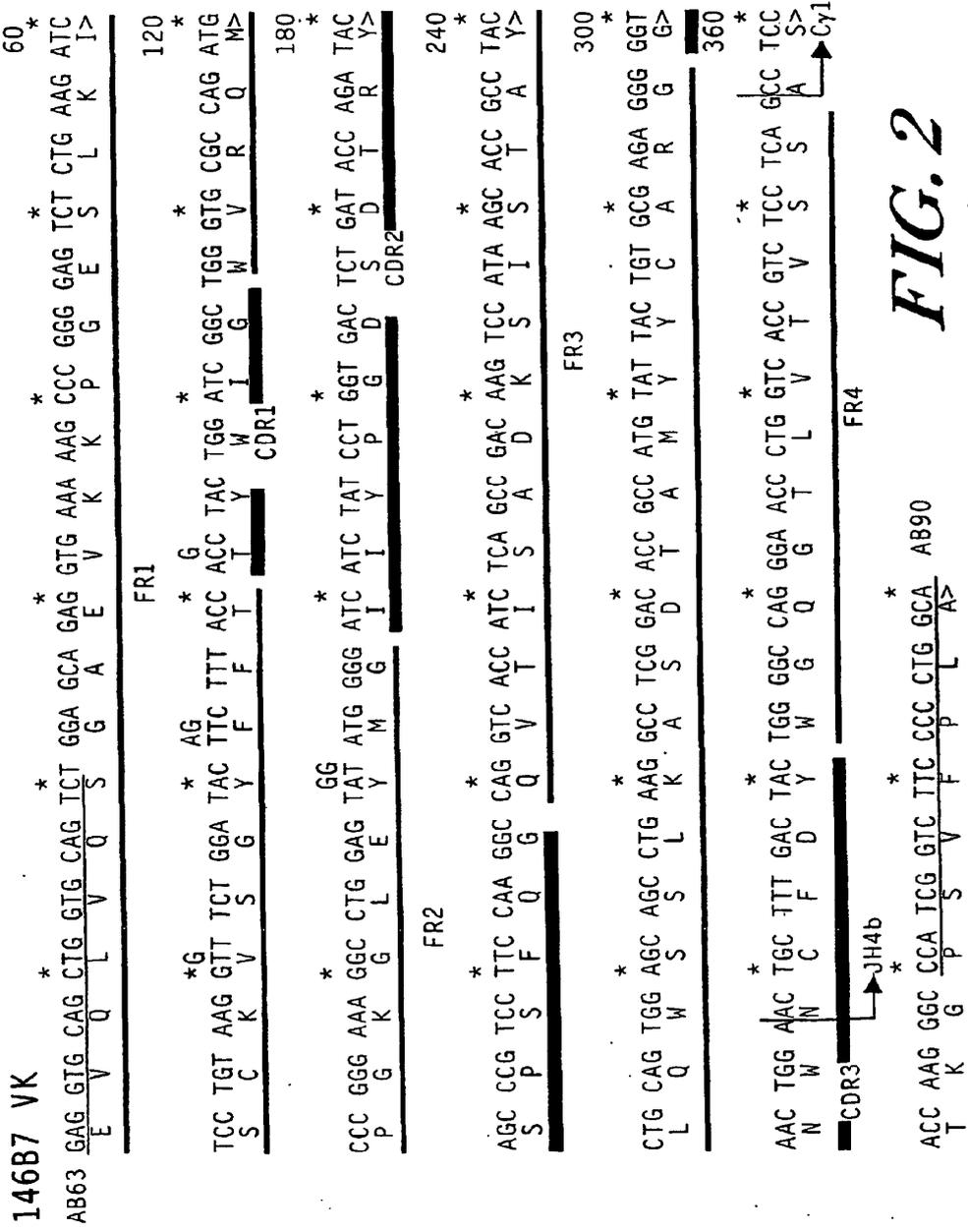


FIG. 1



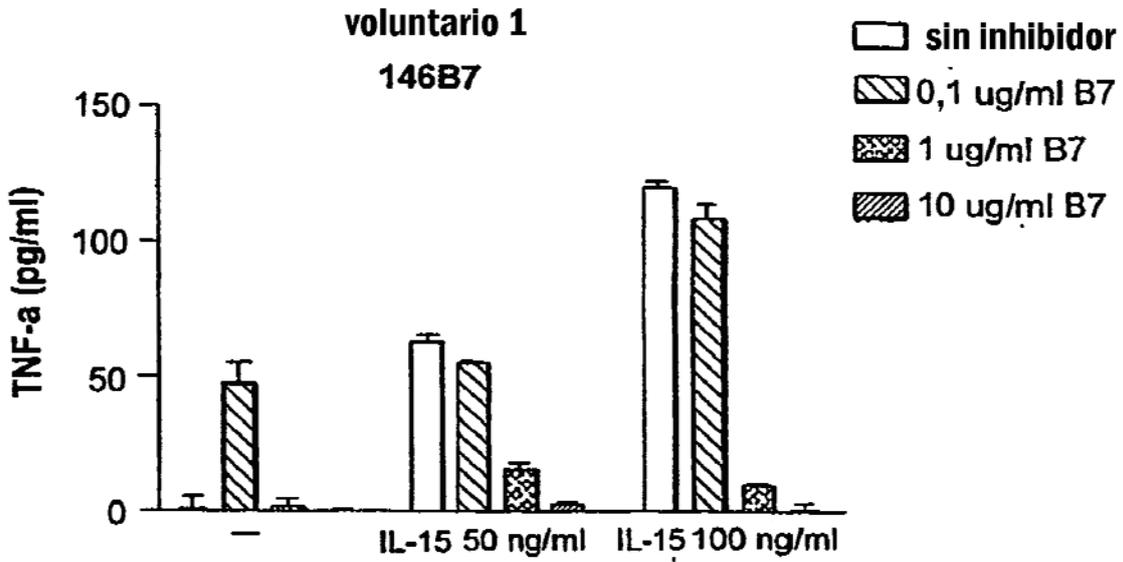


FIG. 4A

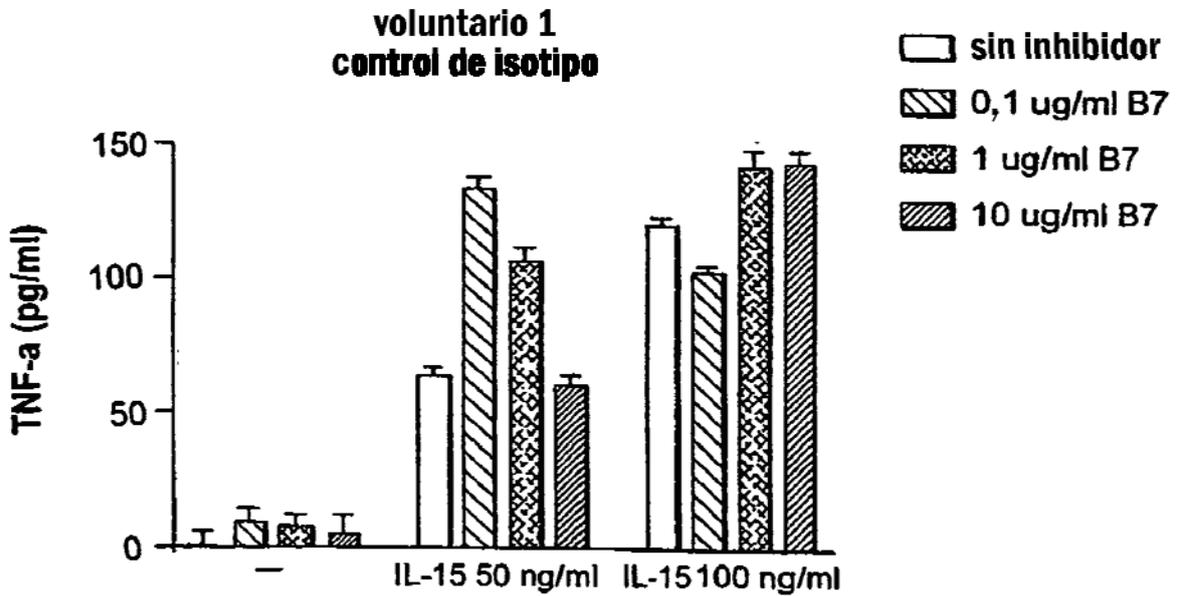


FIG. 4B

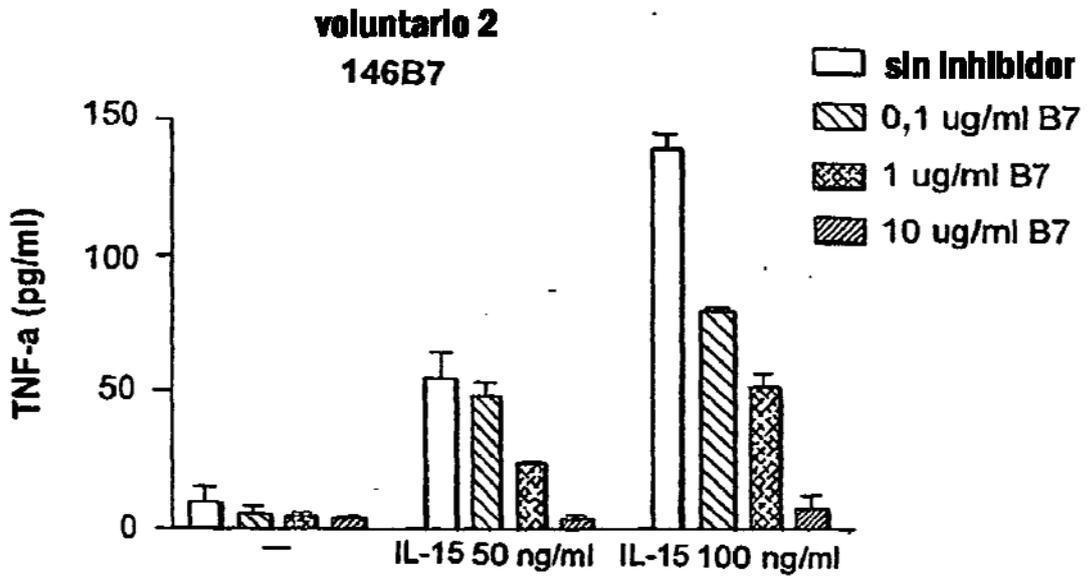


FIG. 4C

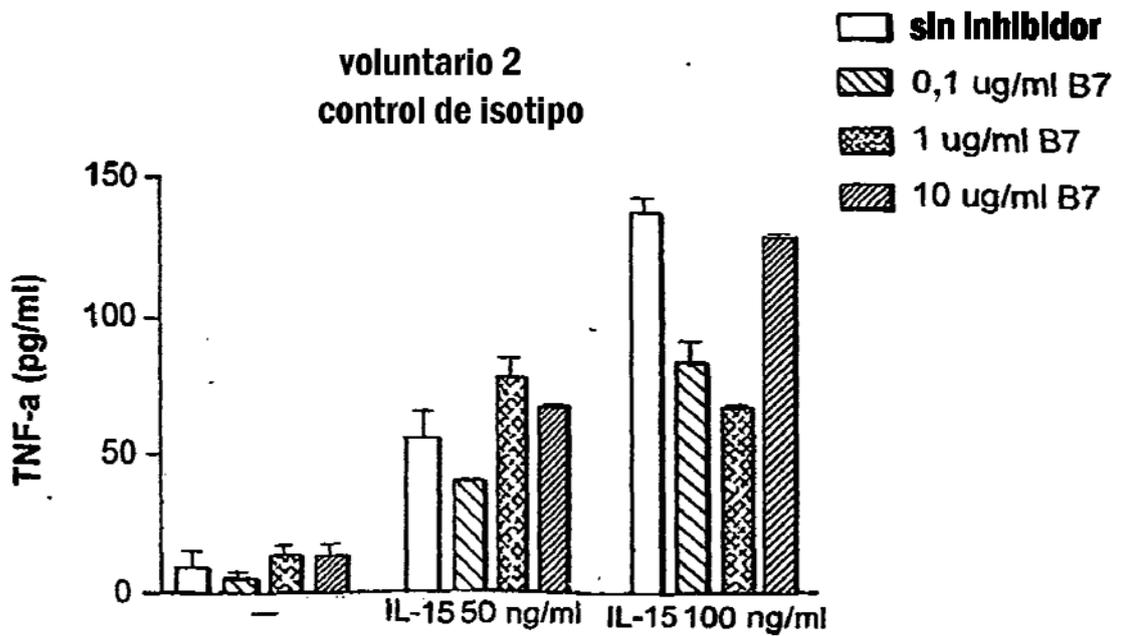


FIG. 4D

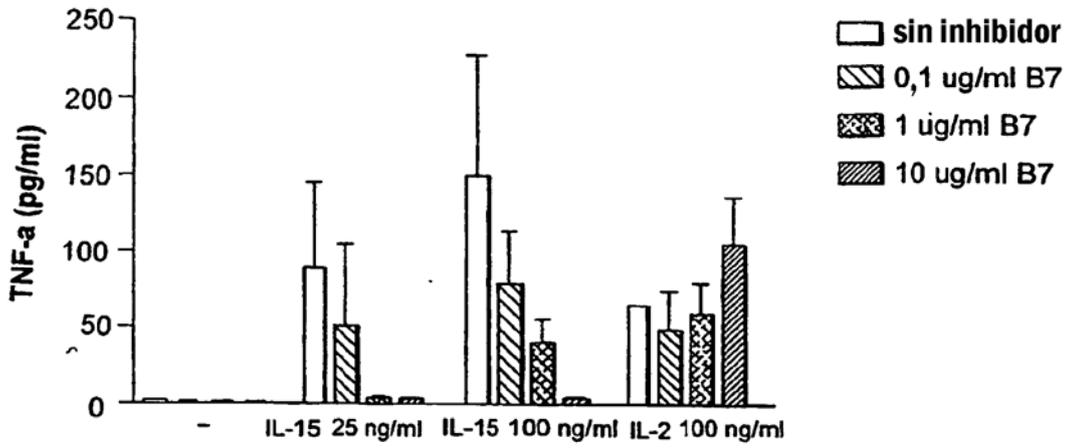


FIG. 5

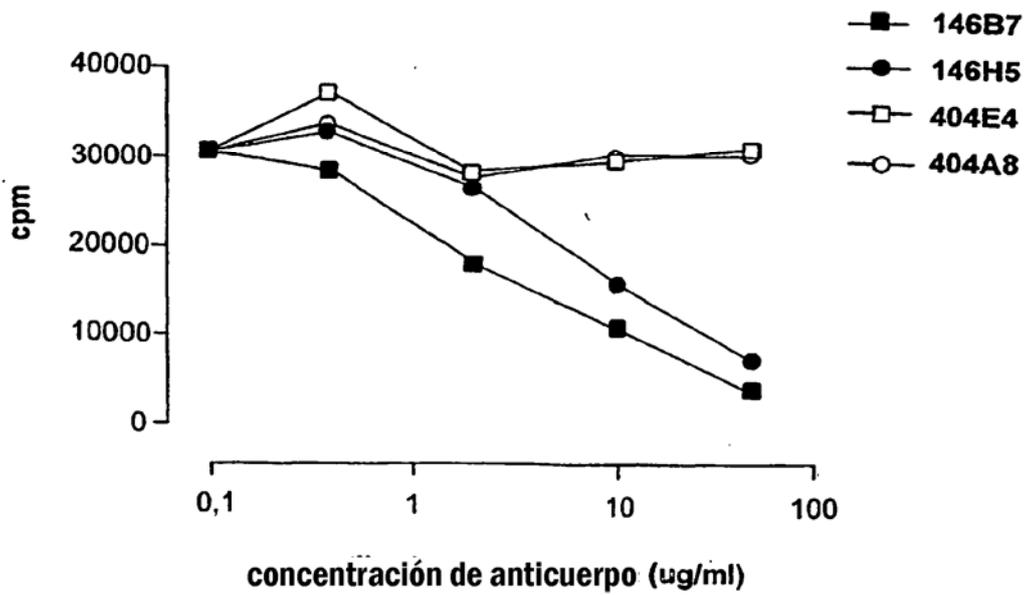


FIG. 6

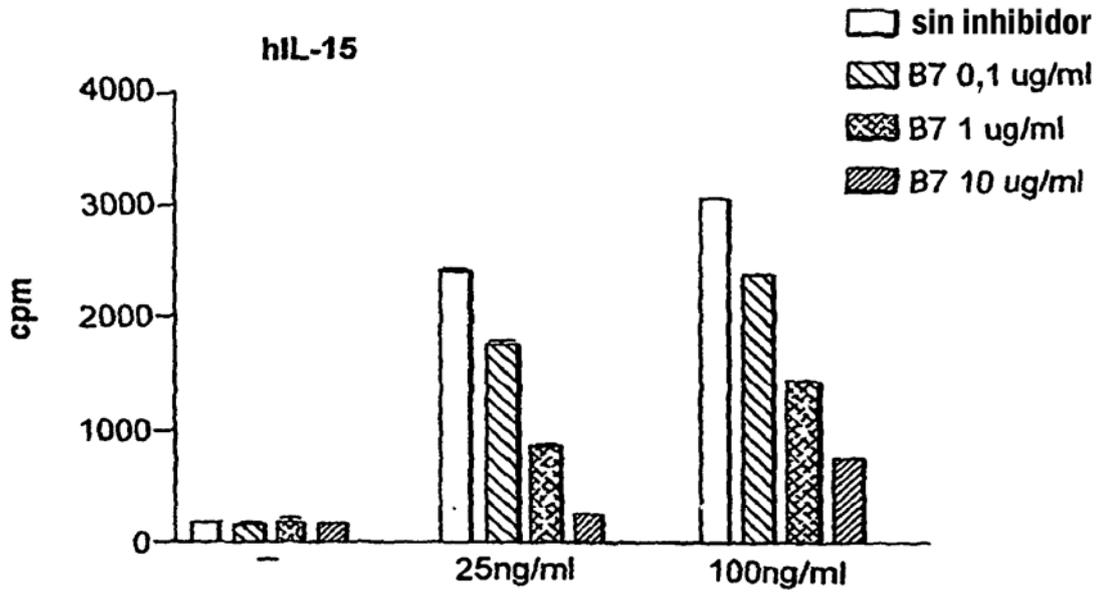


FIG. 7A

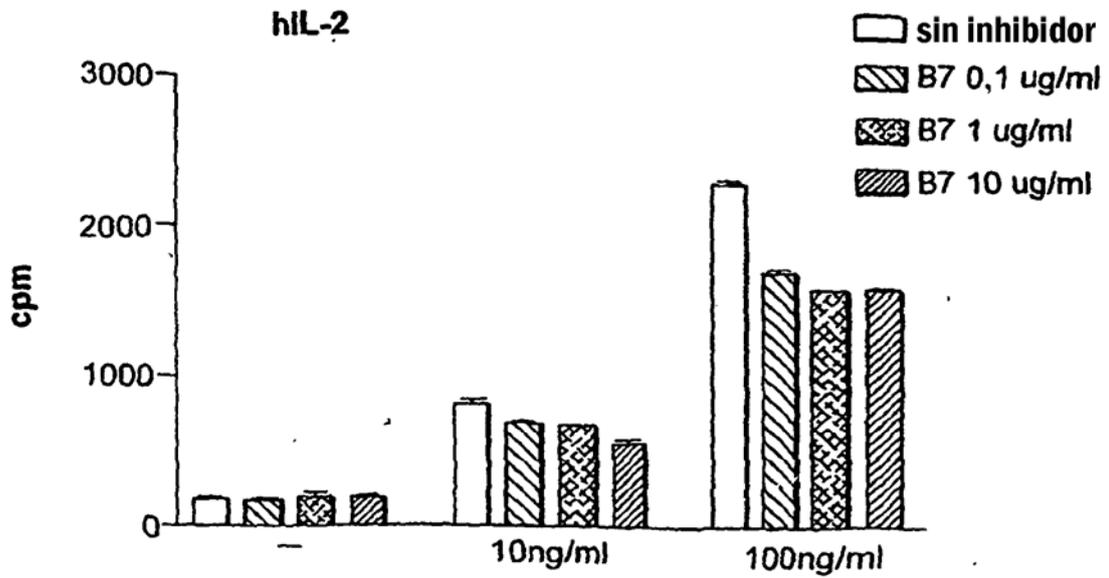


FIG. 7B

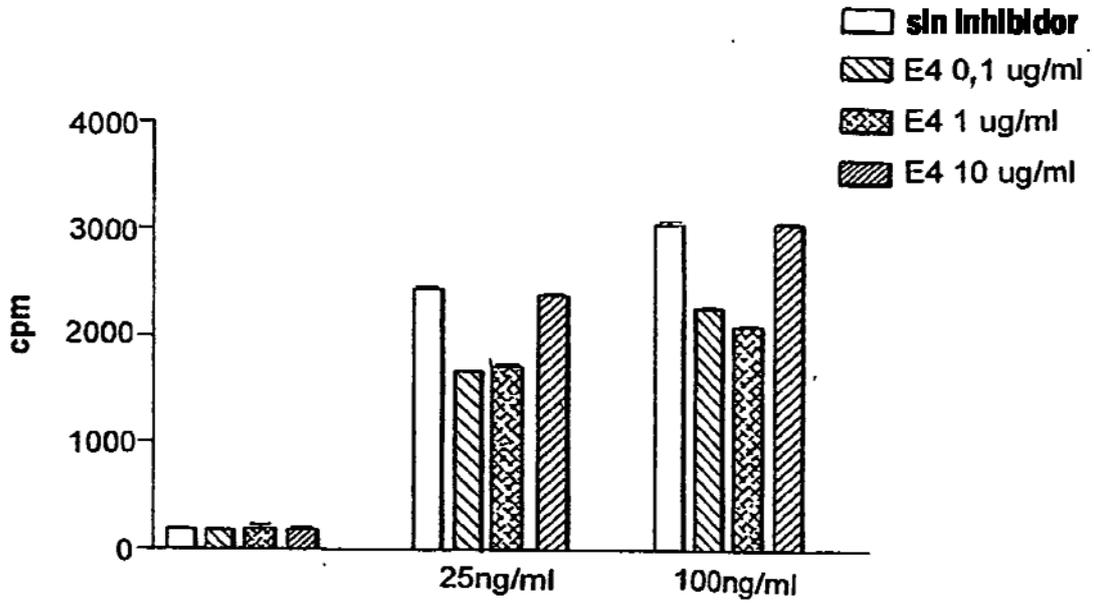


FIG. 8A

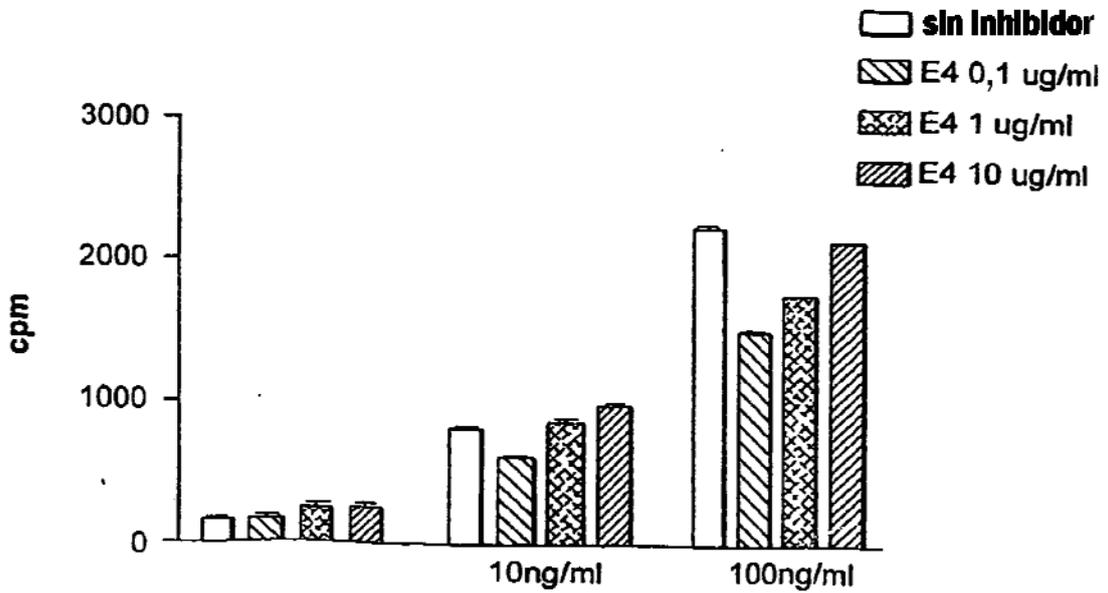


FIG. 8B

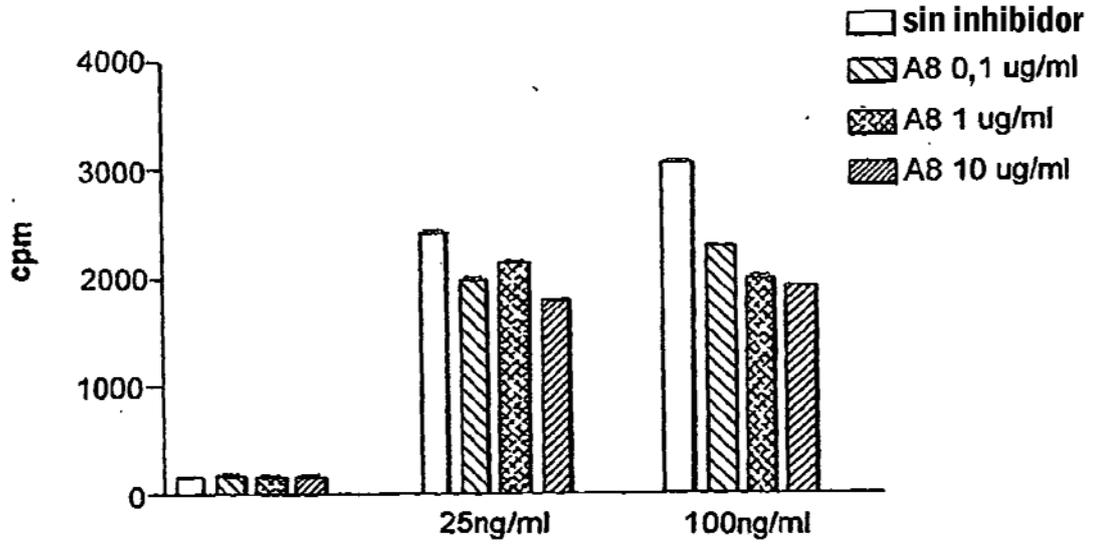


FIG. 9A

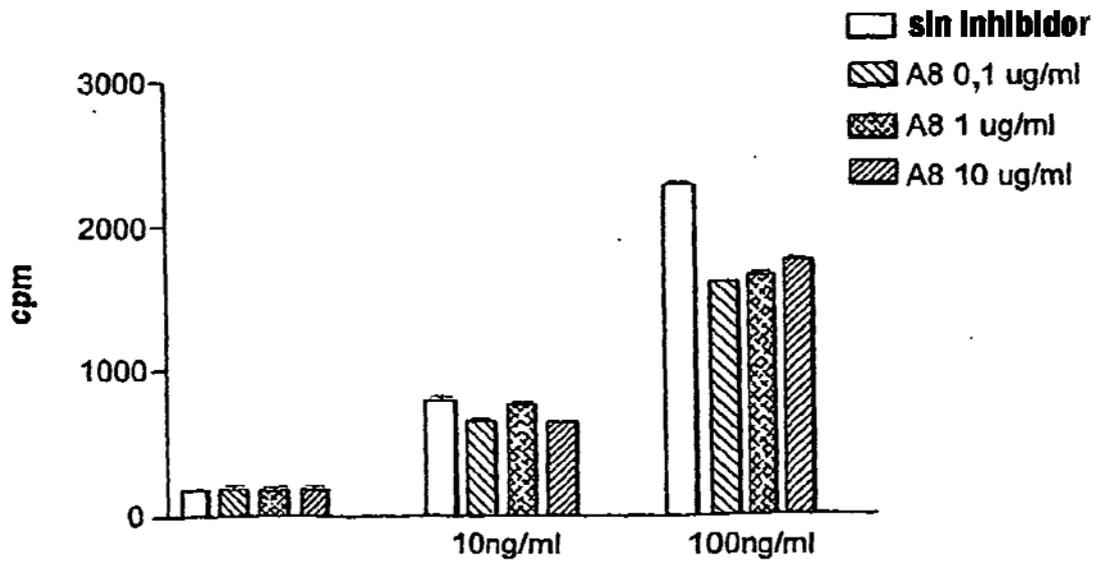


FIG. 9B

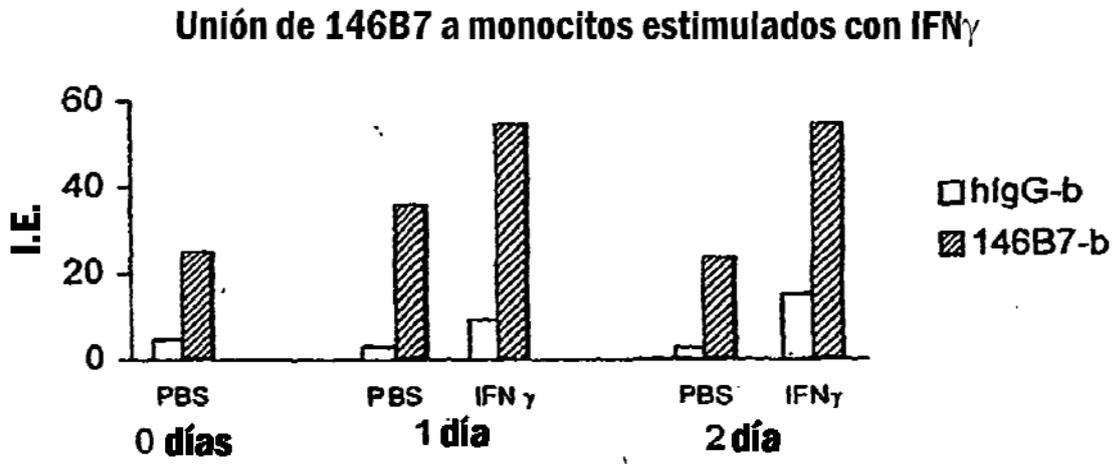


FIG. 10

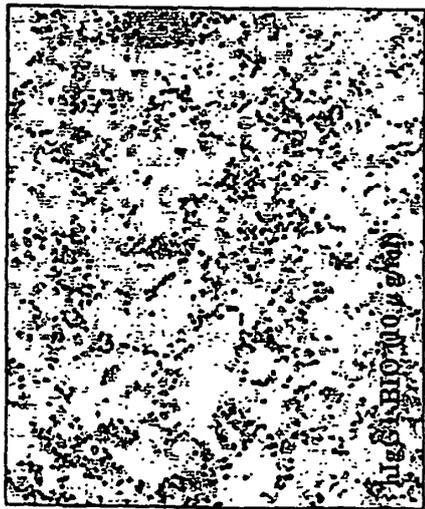
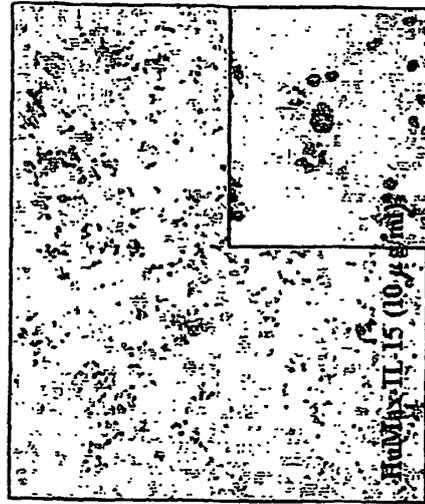


FIG. IIB

FIG. IIA



FIG. 12A *FIG. 12B*

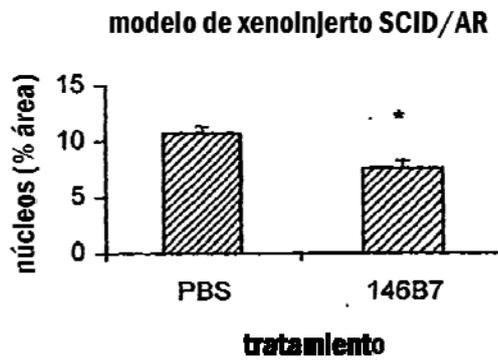


FIG. 13A

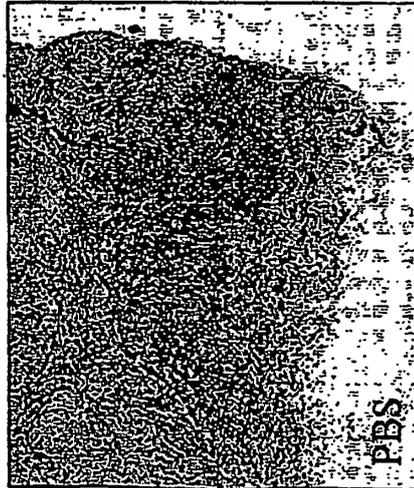
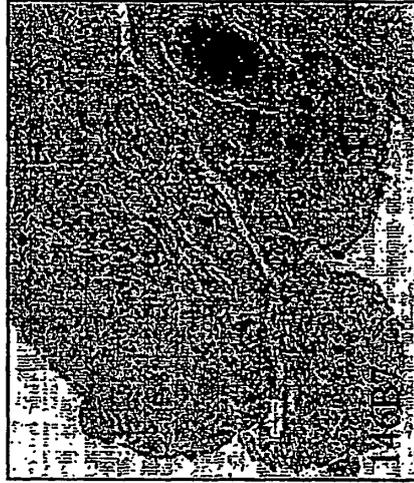


FIG. 13C

FIG. 13B

**efectos de 146B7 sobre el grosor epidérmico:
estrato córneo - comienzo de las crestas epidérmicas**

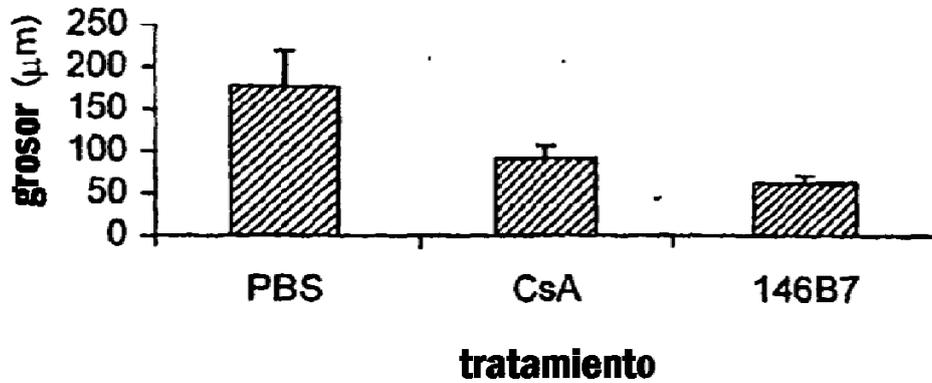


FIG. 14A

**efectos de 146B7 sobre el grosor epidérmico:
estrato córneo - parte más profunda de las crestas epidérmicas**

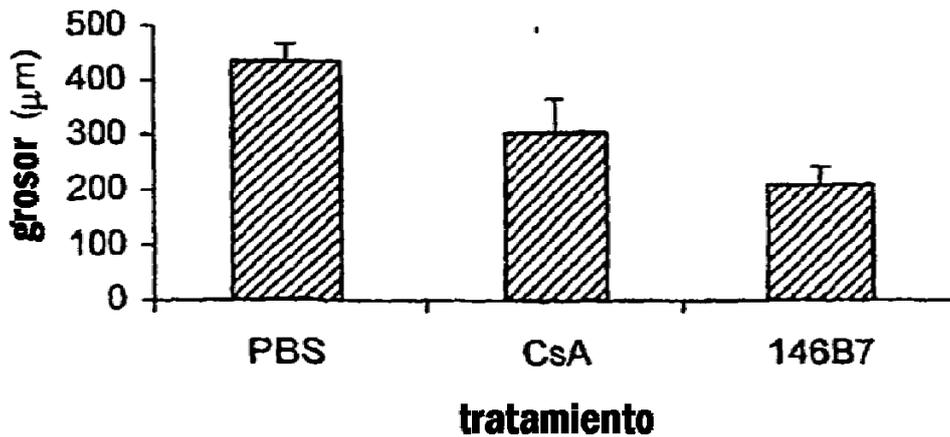


FIG. 14B

efectos de 146B7 sobre la paraqueratosis

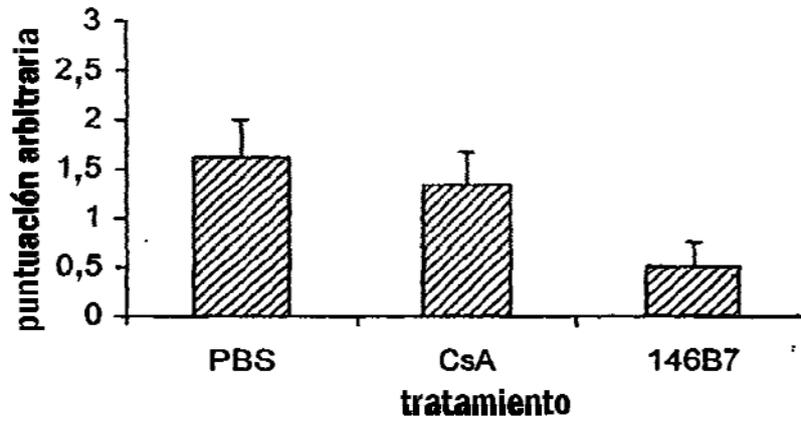


FIG. 14C

efectos de 146B7 sobre las células inflamatorias en la dermis superior

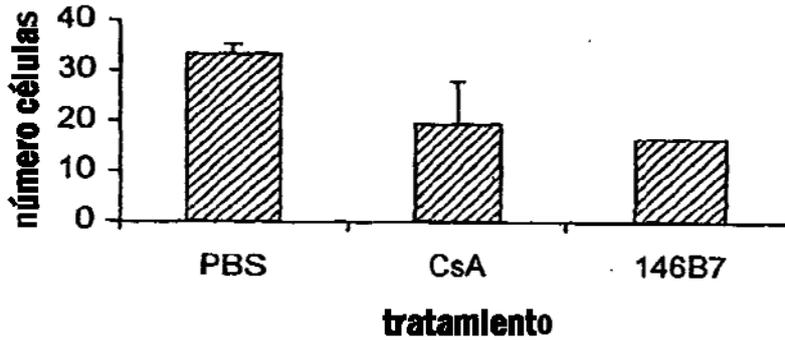


FIG. 14D

efectos de 146B7 sobre la proliferación de queratinocitos KI67+/mm de sección

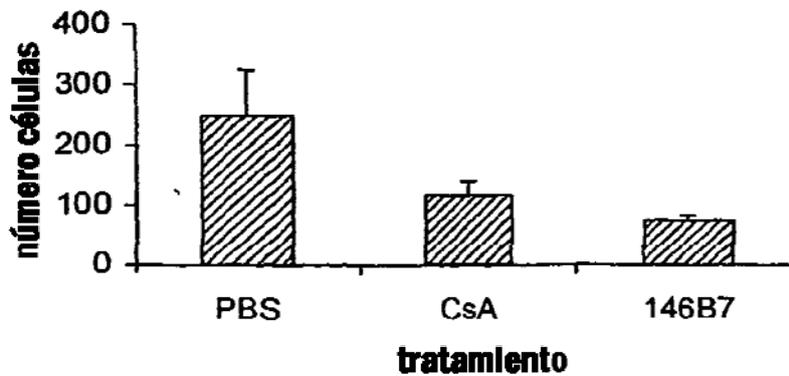


FIG. 14E

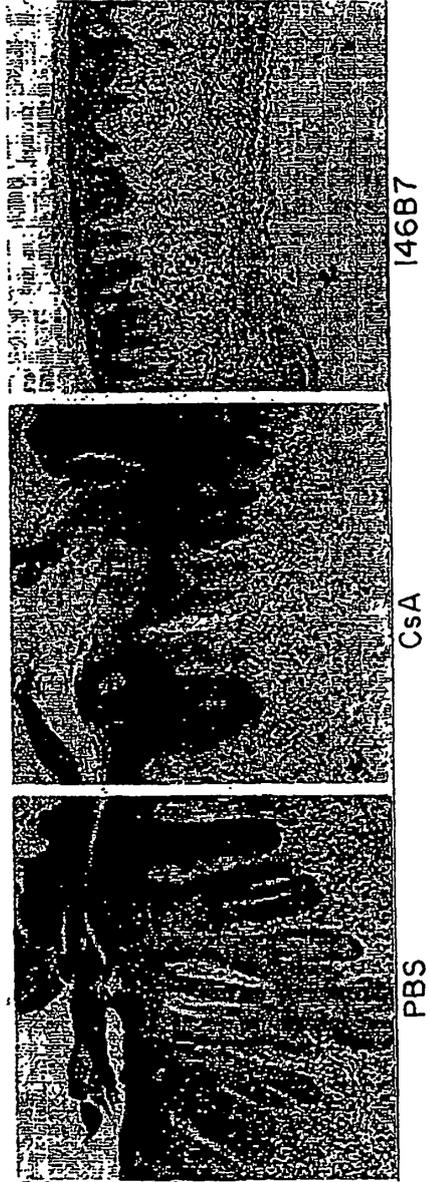


FIG. 15A FIG. 15B FIG. 15C

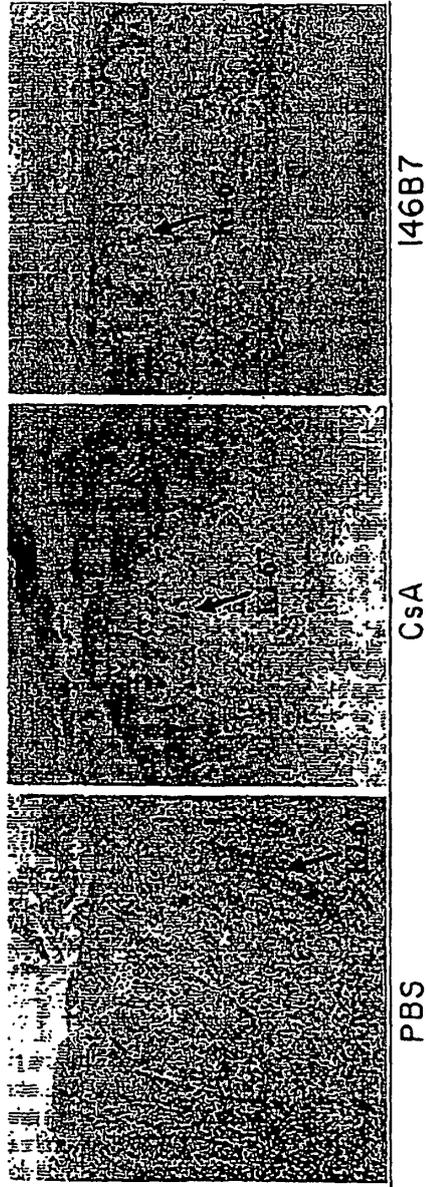


FIG. 16A FIG. 16B FIG. 16C

Unión de 146B7 a complejo IL-15/IL-15Ra en ELISA

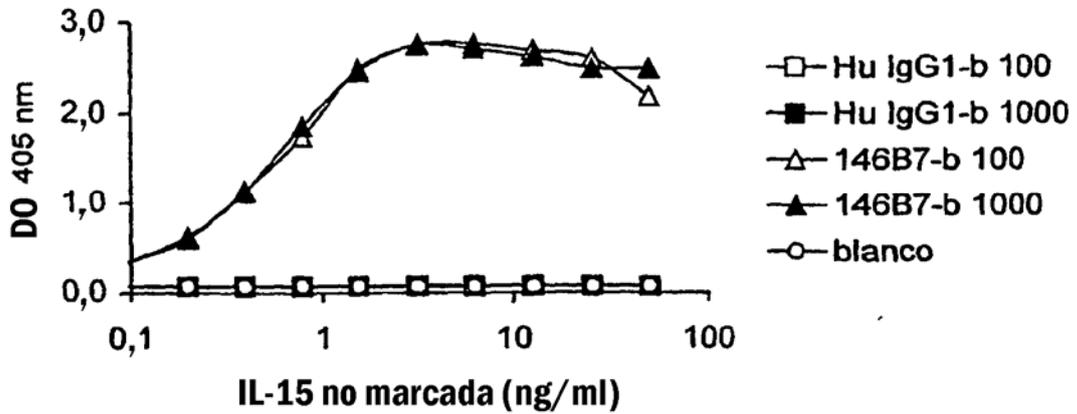


FIG. 17

Unión de 146B7 a IL-15R sobre células Raji

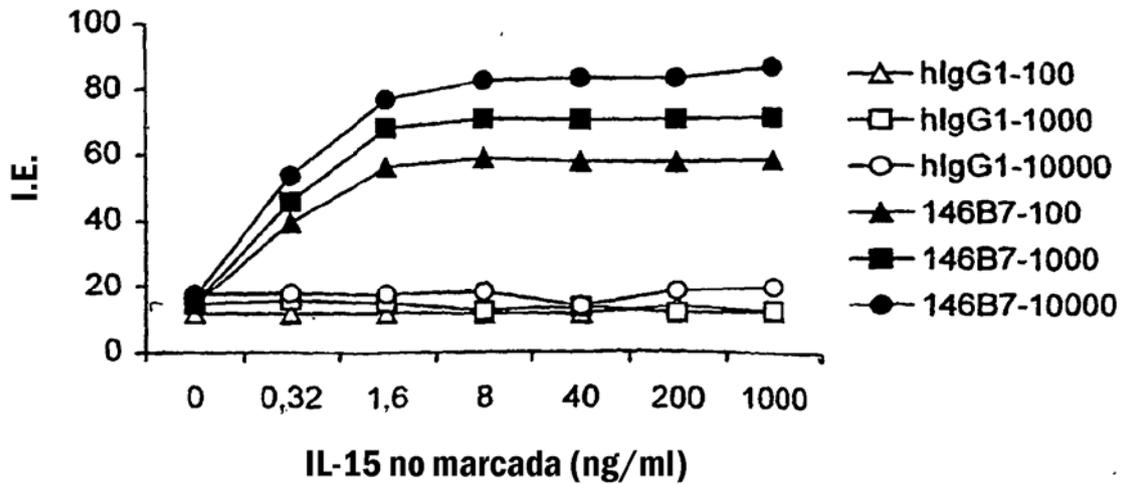


FIG. 18