

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 158**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015 PCT/EP2015/064931**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15731976 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3164414**

54 Título: **Anticuerpos contra IL-15**

30 Prioridad:

02.07.2014 EP 14175361

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.12.2020

73 Titular/es:

**CALYPSO BIOTECH SA (100.0%)
Chemin des Aulx, 14
1228 Plan-les-Ouates, CH**

72 Inventor/es:

**VICARI, ALAIN y
LEGER, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 800 158 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 contra IL-15

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a la interleucina-15 y, en particular, son capaces de neutralizar la actividad de dicha proteína, así como a usos de los mismos como agentes terapéuticos.

10 **Antecedentes de la invención**

La interleucina 15 (IL-15), también conocida como MGC9721, es una citocina proinflamatoria de 14 a 15 kDa que se expresa en múltiples tejidos (placenta, músculo esquelético, riñón, pulmón, corazón, monocitos/macrófagos) y numerosos tipos de células, incluidos monocitos y macrófagos, células dendríticas derivadas de la sangre, células epiteliales y fibroblásticas, a través de diversas condiciones estimuladoras (Fehniger y Caligiuri, 2001, Blood, 97(1):14-32). La interleucina-15 regula la activación, supervivencia y proliferación de linfocitos T y células asesinas naturales (NK). Esta citocina e interleucina 2 (IL-2) comparten muchas actividades biológicas, según sus componentes de señalización de receptor compartidos (IL-2/15R β e IL-2/15R γ). Sin embargo, la especificidad por IL-15 frente a IL-2 se proporciona por un receptor privado de cadena α único que completa el complejo del receptor de alta afinidad heterotrimérico IL-15R $\alpha\beta\gamma$ y por lo tanto permite una respuesta diferencial dependiendo del ligando y el receptor de alta afinidad expresado (Fehniger y Caligiuri, 2001, anteriormente). Además, mientras que la IL-15 soluble es capaz de estimular directamente las células que expresan el receptor de alta afinidad IL-15R $\alpha\beta\gamma$ o el receptor IL-15R $\beta\gamma$ de afinidad inferior, un fenómeno descrito como presentación *cis* de IL-15, se sugirió que la IL-15 unida a IL-15R α , por ejemplo, en la superficie de un tipo de célula podría asociarse con y estimularse a través de la IL-15R $\beta\gamma$ expresada en la superficie de otra célula, un fenómeno descrito como presentación *trans* de IL-15 (Stonier et al., 2010, Immunol. Lett., 127:85-92). Dado que en la circulación, IL-15 también puede asociarse preferentemente con IL-15R α soluble, este mecanismo de presentación *trans* es poco probable que se limite a las interacciones célula-célula (Bergamaschi et al., 2012, Blood 120:e1-e8).

Se ha sugerido un papel perjudicial para una desregulación de la expresión de IL-15 en varios trastornos, incluyen enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad celíaca, así como en neoplasias, tales como leucemias de linfocitos T. En particular, la IL-15 desencadena una vía antiapoptótica en los linfocitos intraepiteliales humanos que se cree que es un nuevo objetivo potencial en la inflamación y la linfomagénesis asociadas a la enfermedad celíaca (Malamut et al., 2010, J. Clin. Invest., 120(6):2131-43). Además, se ha encontrado que la expresión de IL-15 aumenta en la esofagitis eosinófila humana y media la patogénesis similar/relacionada en ratones (Zhu et al., 2010, Gastroenterology, 139(1):182-93). Además, se ha encontrado que en el aumento de la actividad proinflamatoria observada en pacientes con enfermedad de Alzheimer y demencia frontotemporal, la IL-15 puede usarse como marcador ya que sus niveles están elevados en el líquido cefalorraquídeo de esos pacientes (Rentzos et al., 2006, J. Geriatr. Psychiatry Neurol., 19(2):114-7).

También se ha descubierto que la IL-15 desempeña un papel de importancia central en la activación de células inmunes innatas, en particular células NK y linfocitos T en la respuesta de rechazo a trasplante, en particular en el caso de trasplantes de aloinjerto (Ferrari-Lacraz et al., 2011, J Immunol., 167(6): 3478-3485). También se cree que la IL-15 es una miocina, que desempeña diversos papeles en el metabolismo muscular y de las grasas (Raschke y Eckel, 2013, Mediators Inflamm., 320724). El exceso de citocinas proinflamatorias, incluida la IL-15, se ha relacionado con el desgaste, síndromes hipermetabólicos observados durante un traumatismo, lesión y caquexia asociada con cáncer (Martinez-Hernandez et al., 2012, Oncol Rep., 28(4):1443-52). Aunque generalmente se considera que tiene actividades antitumorales a través de la estimulación del sistema inmunitario, también se ha sugerido que la IL-15 desempeña funciones perjudiciales en ciertas formas de cánceres tales como leucemia linfocítica aguda y leucemia linfocítica granular grande, además de su función mencionada anteriormente en la linfomagénesis asociada a la enfermedad celíaca (Cario et al., 2007, J Clin Oncol. 25(30):4813-20). Por lo tanto, sería beneficioso proporcionar anticuerpos potentes y específicos que pudieran unirse a IL-15 y neutralizar sus actividades biológicas para aplicaciones terapéuticas, en particular para el tratamiento de trastornos relacionados con IL-15, especialmente trastornos autoinmunes e inflamatorios. Se ha descrito un anticuerpo monoclonal anti-IL-15 completamente humano (146B7) (Villadsen et al., 2003, J. Clin. Invest., 112: 1571-1580) que no compite con IL-15 por unirse a su receptor IL-15R α pero que interfiere poderosamente con el ensamblaje del complejo de receptor de IL-15 α , β , γ . En un modelo de xenoinjerto de psoriasis humana, el anticuerpo 146B7 redujo la gravedad de la psoriasis. En un ensayo de aumento de dosis de fase I-II con el anticuerpo 146B7 (también conocido como AMG 714) en pacientes con artritis reumatoide activa, se han observado mejoras en la actividad de la enfermedad (Baslund et al., 2005, Arthritis & Rheumatism, 52(9): 2686-2692). Sin embargo, este programa se suspendió por falta de eficacia (Fulmer 2009, T. SciBX 2(36)).[†] Se ha descrito que un anticuerpo monoclonal anti-IL-15 de ratón (B-E29) previene la unión de IL-15 a IL-15R α (Bernard et al., 2004, J. Biol. Chem., 279(23): 24313-34322). Se ha descrito que un anticuerpo anti-IL-15 completamente humano (DISC0280) previene la unión de IL-15 a IL-15R α incluso de forma más potente y eficiente que B-E29 cuando se compara directamente (Finch et al., 2011, Brit. J. Pharmacol., 162:480-490). Si bien DISC0280 fue muy potente y eficiente para neutralizar la actividad de IL-15 *in vitro*, no pudo hacerlo *in vivo*. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que evitar la unión de IL-15 a IL-15R α podría ser perjudicial para la actividad neutralizante de IL-15 *in vivo*.

A pesar de la existencia de anticuerpos anti-IL-15 en la técnica anterior, sigue existiendo la necesidad de desarrollar anticuerpos alternativos anti-IL-15 que muestren propiedades ventajosas en comparación con los anticuerpos de la técnica anterior y/o sean más eficientes y/o se produzcan más fácilmente.

La presente invención satisface esta necesidad proporcionando nuevos anticuerpos humanizados específicos para IL-15 derivados del anticuerpo B-E29 de ratón que no impiden la unión de IL-15 a IL-15R α , pueden neutralizar IL-15 *in vivo* y son más potentes y eficientes en la unión y neutralización de IL-15 que el anticuerpo 146B7.

El documento WO 2004/076620 describe la generación y el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-15 denominados 146B7, 146H5, 404E4 y 404A8.

Resumen de la invención

La presente invención está dirigida principalmente a anticuerpos que se unen a interleucina-15, en particular IL-15 humana, que comprende las regiones variables descritas aquí que derivan de la humanización y la optimización de un anticuerpo anti-IL-15 de ratón.

Un primer aspecto de la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a IL-15 que comprende:

(1) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o una variante de SEQ ID NO: 5, en la que 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente seleccionado de los siguientes:

- (i) VH RH3 está sustituido por glutamina (Q), y/o VH MH5 está sustituido por valina (V), y/o VH AH6 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o VH AH49 está sustituido por serina (S) y/o
- (ii) VH DH61 está sustituido por un ácido glutámico (E) y/o VH SH62 está sustituido por treonina (T), y/o
- (iii) VH MH98 está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), isoleucina (I) o alanina (A), y/o VH WH100C está sustituido por tirosina (Y), fenilalanina (F), o alanina (A), y/o VH MH100E está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), o isoleucina (I), y

(2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicho anticuerpo o fragmento del mismo.

Un tercer y cuarto aspectos de la invención se refieren a un vector de expresión recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico, y a una célula huésped que comprende dicho vector recombinante, respectivamente.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un proceso para producir anticuerpos como se describe a continuación que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos en condiciones suficientes para promover la expresión de dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos.

Un sexto aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de (i) un anticuerpo aislado que se une a IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, (ii) un ácido nucleico, (iii) un vector, y/o (iv) una célula huésped, como se describe aquí, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo o formulación del mismo según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos relacionados con IL-15 tales como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica (tal como una afección hipermetabólica), y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento *ex vivo* para detectar la presencia y/o concentración de la proteína IL-15 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- (i) Proporcionar una muestra biológica de un sujeto,
- (ii) Hacer reaccionar dicha muestra biológica con al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en condiciones suficientes para unir la proteína IL-15 presente en dicha muestra biológica a dicho al menos un anticuerpo o fragmento del mismo a través de interacciones antígeno-anticuerpo; y
- (iii) Detectar una señal proporcional al nivel de complejo de antígeno-anticuerpo formado en la etapa (ii),

en el que la intensidad de la señal se correlaciona con la concentración de proteína IL-15 en la muestra biológica.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de las figuras

Figura 1. Alineamiento de secuencias de regiones variables de variantes humanizadas y quiméricas de ratón B-E29, en comparación con el anticuerpo comparativo 1, B-E29. (A) Regiones variables de cadena pesada: "cVH1" (SEQ ID NO: 32) representa la región variable de cadena pesada del anticuerpo B-E29 de ratón; "cVH2" (SEQ ID NO: 33), "cVH3" (SEQ ID NO: 34) y "cVH4" (SEQ ID NO: 35) son variantes de cVH1; "hVH1" es una forma humanizada de cVH1. (B) Regiones variables de cadena ligera: "cVK1" (SEQ ID NO: 36) representa la región variable de cadena ligera del anticuerpo B-E29 de ratón; "hVK1" (SEQ ID NO: 24), "hVK2" (SEQ ID NO: 37) son dos formas humanizadas de cVK1. Las CDR, como se definen por Kabat están subrayadas, y los residuos clave importantes para la interfaz VH/VL y la estructura de bucle canónica están marcados con un asterisco (*).

Figura 2. Curvas de respuesta a la dosis de la unión de los anticuerpos anti-IL-15 a IL-15 humana según lo determinado por ELISA, expresada como absorbancia a 450 nm. Unión de un anticuerpo anti-IL-15 ejemplar de la invención (huB-E29-1) y el anticuerpo 146B7 a IL-15 humana (A), unión de diversos anticuerpos anti-IL-15 recombinantes a IL-15 de ratón recombinante (B) o IL-15 de rata (C).

Figura 3. Unión de anticuerpos anti-IL-15 a IL-2 humana recombinante según se determina mediante ELISA. Las barras representan los valores duplicados promedio de absorbancia a 450 nm para una concentración fija de 5 µg/ml de anticuerpos anti-IL-15 de prueba o anticuerpos anti-IL-2 de control positivo. La segunda etapa en solitario es la inmunoglobulina anti-humana de HRP en ausencia de anticuerpos de prueba.

Figura 4. Curvas de respuesta a la dosis de la unión de IL-15 humana biotinilada a IL-15R α -Fc en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos según se determina por ELISA, expresadas como absorbancia a 450 nm. La unión de tres anticuerpos anti-IL-15 ejemplares de la invención se muestra en comparación con la de un anticuerpo de control que se sabe que bloquea la unión de IL-15 a IL-15R α , y a la unión de IL-15 biotinilada en ausencia de anticuerpo o en ausencia de IL-15R α -Fc.

Figura 5. Enumeración de células NK en el bazo de ratones inyectados con vehículo (sin tratar) o con complejo IL-15/IL-15R α -Fc seguido de anticuerpos anti-IL-15 ejemplares o un isotipo IgG1 humano de control. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de 5 animales por grupo.

Figura 6. Efectos de huB-E29-2, 146B7 y anticuerpos de isotipo de control sobre la prevención de la apoptosis inducida por IL-15 y la fosforilación de STA5 en tres líneas celulares primarias de RCD de tipo II. Los resultados se normalizaron a niveles en condiciones de control (medio, establecido al 100 %) para el porcentaje de células apoptóticas (A) o la MFI de la expresión intracelular de STAT5 fosforilada (B) inducida por IL-15, y se expresaron como media más desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos con líneas celulares RCD IEL de tipo II de tres pacientes diferentes.

Figura 7. Enumeración de linfocitos intraepiteliales CD3⁺CD8⁺ (IEL) en ratones transgénicos T3b-hIL-15 tratados durante dos semanas con dos inyecciones intraperitoneales semanales de 100 µg de huB-E29-2 (círculos de color negro) o anticuerpos de isotipo de control (círculos de color blanco). Cada símbolo representa un ratón individual, y se representan la media grupal más la desviación estándar (DE). Análisis estadístico: Prueba t de Student no pareada.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

Los términos "interleucina 15", "interleucina-15", "IL-15", designan aquí la proteína interleucina 15, también conocida como MGC9721, que es una citocina proinflamatoria de 14 a 15 kDa que, en seres humanos, se codifica por el gen *IL-15* cuya secuencia se describe en el Hugo Gene Nomenclature Committee ID 5977. La forma inmadura de IL-15 comprende 162 aminoácidos, donde los primeros 29 aminoácidos constituyen el péptido señal, y los aminoácidos 30 a 48 el propéptido. La forma inmadura de IL-15 está disponible con el número de acceso UniProtKB P40933. La forma madura de la proteína IL-15 corresponde a los aminoácidos Asn 49 a Ser 162, donde las posiciones indicadas corresponden a las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de IL-15 inmadura. La secuencia de aminoácidos de IL-15 madura humana corresponde a la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos de la IL-15 inmadura de otras especies están disponibles en la técnica e incluyen, por ejemplo, IL-15 de ratón (número de acceso UniProtKB P48346, correspondiente a la forma madura de IL-15 de SEQ ID NO: 2), IL-15 de rata (número de acceso UniProtKB P97604, correspondiente a la forma madura de IL-15 de SEQ ID NO: 3), IL-15 de macaco Rhesus (acceso UniProtKB NP_001038196, XP_001091166, XP_001091289 XP_001091416, correspondiente a la forma madura de IL-15 de SEQ ID NO: 4) e IL-15 de mono *Cynomolgus* (secuencia predicha del NCBI número de acceso XP_005556036.1, correspondiente a la forma madura de IL-15 de SEQ ID NO: 4). El término "interleucina 15" también incluye cualquier variante o isoforma de interleucina 15 que las células expresan de forma natural. Es de destacar que se han informado dos variantes de transcrito de IL-15 de corte y empalme alternativo. Aunque ambas isoformas producen la misma proteína madura, difieren en su tráfico celular.

El término "anticuerpo" como se menciona en el presente documento designa un polipéptido que se une a un antígeno. Esto incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno. El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos adicionales modificados por ingeniería genética, siempre que se conserven las propiedades características de la invención, en particular, la capacidad de unión al antígeno diana (tal como IL-15), y opcionalmente al mismo epítipo de IL-15 que el reconocido por los anticuerpos de la invención. Los

ejemplos de anticuerpos y fragmentos de los mismos incluyen un fragmento de dominio variable ("Fv", que consiste en los dominios VH y VL de un solo brazo de un anticuerpo), fragmento Fab (fragmento monovalente que consiste en los dominios VH, VL, CH1 y CL), Fragmento Fab₂ (bivalente), fragmento Fab₃ (trivalente), fragmento Fab' (Fab con región bisagra), fragmento F(ab')₂ (fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra), fragmento Fd (que consiste en los dominios VH y CH1), rIgG (IgG reducida o media IgG), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio (dAb), anticuerpos monovalentes, anticuerpos divalentes o multivalentes que comprenden un fragmento de más de un anticuerpo, fragmento variable monocatenario (ScFv), bis-scFv (biespecífico), y derivados de anticuerpos tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, péptidos que comprenden CDR, así como fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores (Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23(9): 1126-1136). Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). En los mamíferos, la cadena pesada puede ser alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ) o mu (μ), que define la clase de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. En los mamíferos, la cadena ligera puede ser lambda (λ) o kappa (κ). En los mamíferos, dependiendo de la clase de anticuerpo, la región constante de cadena pesada comprende tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3 (para IgA, IgD, IgG) o cuatro dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2, CH3 y CH4 (para IgE e IgM). La región constante de cadena ligera comprende un dominio de inmunoglobulina, CL. Un anticuerpo puede tener la estructura de una IgA, IgG, IgE, IgD e IgM, así como cualquier subtipo de la misma. Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, incluyendo, en particular, primates (primates humanos y no humanos) y fuentes primatizadas.

El término "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)) como se usa en el presente documento se refiere a cada uno del par de dominios de cadena ligera y pesada que están directamente involucrados en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general, y cada dominio comprende cuatro regiones marco ("FW") cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones marco adoptan una conformación de lámina β, y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman, junto con las CDR de la otra cadena, el sitio de unión a antígeno. El término "porción de unión a antígeno de un anticuerpo", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La porción de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FW" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. Por lo tanto, los dominios variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo comprenden del extremo N a C: los dominios FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3 y FW4. Los residuos de las regiones CDR y FW se numeran convencionalmente según la definición estándar de Kabat et al (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación N.º 91-3242). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, excepto cuando se indique de otro modo. Las designaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente a la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o adicionales que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea una región marco o región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica de dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Las CDR del dominio variable de cadena pesada se encuentran en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Las CDR del dominio variable de cadena ligera se encuentran en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (L3) según el sistema de numeración de Kabat.

En la presente solicitud, a menos que se especifique de otro modo, para todos los dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, la numeración es según el "sistema de numeración de Kabat" (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación N.º 91-3242).

En la presente solicitud, a menos que se especifique de otro modo, para todos los dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina humana, la numeración es según el "sistema de numeración EU" (Edelman et al, 1969, Proc Natl Acad Sci, 63(1): 78-85).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por algún

procedimiento particular.

El término "anticuerpo quimérico" generalmente se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara usualmente mediante técnicas de ADN recombinante. Un ejemplo típico de anticuerpos quiméricos incluye aquellos que comprenden una región variable de ratón y una región constante humana. Como se define aquí, este término también incluye un anticuerpo que comprende al menos una de las CDR de un primer anticuerpo humano y al menos una porción de una región constante de un segundo anticuerpo humano. También incluye un anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de un primer anticuerpo humano y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un segundo anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humanizado" designa anticuerpos de una especie no humana que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dicha especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender además uno o más residuos marco derivados de la especie no humana de la que se derivaron las CDR.

El término "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano" se refiere a anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes de las cadenas tanto pesada como ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, pero no necesariamente del mismo anticuerpo.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha separado de un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo aislado se ha purificado a más del 95 % o 99 % de pureza según lo determinado por los procedimientos en la técnica (véase, por ejemplo, Flatman et al., 2007, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 848: 79-87) incluyendo procedimientos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoelectrico, electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa (cromatografía líquida de alto rendimiento)).

Los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se refieren a un polímero que comprende nucleótidos. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico incluyen ADN, ARN, ácido nucleico bloqueado (LNA), ADN complementario (ADNc).

Por "polipéptido" se entiende un péptido, un oligopéptido, un oligómero o una proteína que comprende al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico normal o modificado, tal como en el caso de los péptidos isostéricos, por ejemplo. Un polipéptido puede estar compuesto por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos definidos por el código genético. Un polipéptido puede estar compuesto igualmente por aminoácidos modificados por procesos naturales, tales como procesos de maduración postraduccionales o por procesos químicos, que se conocen bien por un experto en la técnica. Dichas modificaciones están completamente detalladas en la bibliografía. Estas modificaciones pueden aparecer en cualquier parte del polipéptido: en el esqueleto peptídico, en la cadena lateral o incluso en los extremos carboxi o amino terminales. Por ejemplo, se entiende que las modificaciones polipeptídicas incluyen acetilación, aclación, ribosilación de ADP, amidación, fijación covalente de flavina, fijación covalente de hemo, fijación covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, fijación covalente de un lípido o de un derivado lipídico, la fijación covalente de un fosfatidilinositol, reticulación covalente o no covalente, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación incluyendo pegilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesos proteolíticos, fosforilación, prenilación, racemización, seneloilación, sulfatación, adición de aminoácidos tal como arginilación o ubiquitinación. Dichas modificaciones se detallan completamente en la bibliografía (*Proteins Structure and Molecular Properties* (1993) 2ª Ed., T.E. Creighton, Nueva York; *Post-translational Covalent Modifications of Proteins* (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York; Seifter et al. (1990) *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, *Meth. Enzymol.* 182: 626-646 y Rattan et al., (1992) *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, *Ann NY Acad Sci*, 663: 48-62).

Se entiende por "polinucleótido aislado" o "polipéptido aislado" un polinucleótido o un polipéptido tal como se ha definido previamente que se aísla del cuerpo humano o se produce de otro modo mediante un proceso técnico.

El término "variante" puede aplicarse a un polinucleótido y/o un polipéptido. Por ejemplo, una variante de un péptido o polipéptido, como se denomina en el presente documento, significa un péptido o polipéptido sustancialmente homólogo a la secuencia peptídica de referencia, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la de la secuencia de referencia debido a una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos. Sustancialmente homólogo significa una secuencia de aminoácidos variante que es idéntica a la secuencia peptídica de referencia, excepto por la eliminación, inserción y/o sustitución de algunos aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos. Sustancialmente homólogo significa una secuencia de aminoácidos variante que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia. Una secuencia de ácido nucleico variante puede ser al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico

de referencia. La identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar mediante inspección visual y/o cálculo matemático, o más fácilmente comparando información de secuencia usando un programa informático conocido utilizado para la comparación de secuencias, tal como el paquete Clustal versión 1.83. Una variante puede comprender una secuencia que tiene al menos un aminoácido sustituido conservativamente, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Se conocen bien otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares (Kyte, et al., 1982, J. Mol. Biol., 157: 105131). Por ejemplo, una "sustitución conservadora de aminoácidos" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácidos nativo con un residuo no nativo de tal manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácidos en esa posición. Como alternativa, las sustituciones para uno o más aminoácidos presentes en el polipéptido original no son conservadoras, lo que puede generar una variante con propiedades modificadas en comparación con el anticuerpo de referencia. Los expertos en la técnica pueden determinar las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservadoras o no conservadoras) en el momento en que se deseen dichas sustituciones. El término "variante" también incluye un péptido o polipéptido sustancialmente homólogo a la secuencia peptídica de referencia, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la de la secuencia de referencia porque uno o más aminoácidos se han modificado químicamente o se han sustituido por análogos de aminoácidos. Este término también incluye polipéptidos glucosilados. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante del epítipo incluye agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "unir" o "unión" de un anticuerpo a un antígeno diana significa una interacción o asociación al menos temporal de dicho anticuerpo con, o a, dicho antígeno diana (tal como IL-15) o con, o a, fragmentos de dicho antígeno diana que comprende un epítipo reconocido por dicho anticuerpo. Como se usa aquí, un anticuerpo que se une a IL-15 también se denomina anticuerpo anti-IL-15.

Los términos "se une selectivamente", "se une específicamente", "específico para", cuando se aplican a un anticuerpo, indican que el anticuerpo reconoce y/o se une preferentemente al polipéptido o epítipo diana, es decir, con una afinidad más alta que cualquier otro antígeno o epítipo, es decir, la unión al polipéptido diana puede discriminarse de la unión no específica a otros antígenos. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante diálisis de equilibrio, unión de equilibrio, resonancia por plasmones superficiales o espectroscopia (por ejemplo, usando un ensayo de fluorescencia). Especialmente, cuando se usa la tecnología de resonancia por plasmones superficiales (SPR), los eventos de unión biomolecular causan cambios en el índice de refracción en una capa superficial donde uno de los compañeros de unión está inmovilizado, que se detectan como cambios en la señal de resonancia por plasmones superficiales expresados como unidades de respuesta (UR). Al medir la cinética de unión en tiempo real de un anticuerpo a su antígeno diana, la tecnología SPR puede determinar qué tan rápida es la asociación entre el anticuerpo y su diana (medida como constante de asociación K_a o $K_{asociación}$), qué tan fuerte es su asociación (medida como constante de disociación K_d o $K_{disociación}$). La afinidad de un anticuerpo por su diana puede medirse cuantitativamente determinando su constante de disociación de equilibrio, K_D , definida como $K_D = k_d/k_a$, donde k_a es la tasa de asociación ($K_{asociación}$) y k_d la tasa de disociación ($K_{disociación}$) (Murphy, et al., 2006, Curr Protoc Protein Sci, Capítulo 19: Unidad 19.14). La comparación de las propiedades de afinidad y/o unión entre dos anticuerpos puede establecerse sin determinar realmente el valor de K_D para cada anticuerpo, pero basándose en una medición cuantitativa de la unión (por ejemplo, por análisis ELISA o FACS) que es proporcional a la K_D , o una medición cualitativa de afinidad o una inferencia de afinidad (por ejemplo, en un ensayo funcional o en un ensayo *in vitro* o *in vivo*). El término actividad de "bloqueo" o "neutralización" de un anticuerpo se refiere a su capacidad para inhibir la actividad de su diana. La actividad neutralizante de un anticuerpo puede determinarse mediante ensayos *in vitro* o ensayos *in vivo* o ensayos funcionales. Aplicado a un anticuerpo que se une a IL-15, este término se refiere a la capacidad del anticuerpo para neutralizar generalmente la actividad de IL-15, que puede corresponder, por ejemplo, a la inhibición de la proliferación y/o supervivencia inducida por IL-15 de linfocitos T activados, células asesinas, linfocitos T asesinos naturales y linfocitos B o cualquier otra célula que exprese el IL-15R $\alpha\beta\gamma$ heterotrimérico o el receptor IL-15R $\beta\gamma$ heterodimérico (Finch, et al., 2011, Br J Pharmacol. 162:480-90), la síntesis de inmunoglobulina inducida por IL-15 por linfocitos B estimulados por ligando anti-IgM o CD40 (Litinskiy et al., 2012, Nat Immunol., 3:822-9), la activación inducida por IL-15 de neutrófilos humanos (Rathné y Girard, 2004, J Leukoc Biol., 76:162-8), y la producción inducida por IL-15 de citocinas proinflamatorias de macrófagos, células dendríticas o células epiteliales (Nanayakkara, et al., 2013, Am J Clin Nutr., 98:1123-35). En particular, la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-IL-15 se puede evaluar midiendo su capacidad para inhibir la proliferación y/o supervivencia inducida por IL-15 de líneas celulares tales como células Kit 225 o M-07e como se describe en la sección de ejemplos. Dado que IL-15 puede actuar directamente, y en solitario, sobre las células que expresan el IL-15R $\alpha\beta\gamma$ heterotrimérico o el receptor IL-15R $\beta\gamma$ heterodimérico (señalización *cis*) o cuando ya está unida al receptor IL-15R α (señalización *trans*) (Stonier, et al., 2010, anteriormente), un anticuerpo que se une a IL-15 podría neutralizar cualquiera o ambas presentaciones *cis* y *trans* de IL-15. La "potencia" de un anticuerpo puede expresarse como la concentración de anticuerpo/fragmento de unión a antígeno que produce el efecto medio máximo a una concentración de antígeno dada. Por ejemplo, el

"efecto" de un anticuerpo puede ser la inhibición o neutralización de su actividad diana. En este caso, la concentración de anticuerpos que produce la inhibición media máxima se puede denominar CI_{50} , que se administra en mol/l o M. Si la unión es el "efecto" medido de un anticuerpo, tal como en un ensayo ELISA, la capacidad de unión media máxima (BC_{50}) de tal anticuerpo puede expresarse como la concentración de anticuerpo que produce la señal media máxima a una concentración de antígeno dada, que se administra en mol/l o M. La potencia suele estar influenciada por la afinidad, a una concentración de antígeno dada, hasta que se alcanza una afinidad más allá de la cual las mejoras adicionales y no mejorarán la unión del antígeno (el llamado techo de potencia). Aplicada a un anticuerpo contra IL-15, la potencia puede determinarse, por ejemplo, midiendo el valor de CI_{50} de la proliferación y/o supervivencia inducida por IL-15 de líneas celulares tales como células Kit 225 o M-07e en presencia del anticuerpo, o el valor de BC_{50} para unirse a IL-15 de diferentes fuentes o especies.

El término "función efectora", como se usa en el presente documento, incluye un evento bioquímico que es resultado de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por Fc γ R tales como ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y ADCP (fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos), y funciones efectoras mediadas por el complemento tal como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una función efectora de un anticuerpo puede modificarse alterando, es decir, potenciando o reduciendo, preferentemente potenciando, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor Fc o un componente del complemento. La afinidad de unión de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando Fc puede alterarse modificando el sitio de unión de la molécula efectora. También es posible que una alteración en el sitio de unión en el anticuerpo para la molécula efectora altere la geometría de la interacción sin alterar significativamente la afinidad de unión global, haciendo que el mecanismo efector sea ineficaz como en la unión no productiva. También es posible alterar una función efectora modificando un sitio que no está directamente involucrado en la unión a molécula efectora, sino que también está involucrado en el rendimiento de la función efectora. Al alterar una función efectora de un anticuerpo, es posible controlar diversos aspectos de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, potenciando o suprimiendo diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo compuesto por un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable.

El término "vehículo" se refiere a cualquier componente presente en una formulación farmacéutica que no sea el agente activo y, por lo tanto, incluye diluyentes, aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, cargas, agentes colorantes, agentes humectantes o agentes emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, conservantes y similares.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" y "tratar" y similares generalmente significan obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o prevenir parcialmente una enfermedad, síntoma o afección de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, afección, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene, por ejemplo, basándose en los antecedentes familiares; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar una regresión de la enfermedad y/o sus síntomas o afecciones, tal como la mejora o reparación del daño. Por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad celíaca comprende prevenir, disminuir o incluso erradicar los síntomas de la enfermedad o trastorno, por ejemplo, alivio parcial o total del dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso involuntaria, síndrome de malabsorción y anomalías de la mucosa intestinal tales como atrofia vellosa, erosiones, úlceras e infiltración de linfocitos intraepiteliales normales o anormales.

Los términos "enfermedades y/o trastornos relacionados con IL-15" incluyen enfermedades y trastornos caracterizados por una sobreexpresión de IL-15 y/o niveles aumentados y/o expresión anormal de IL-15 por una célula u órgano, y/o expresión anormal de una variante de IL-15 por una célula u órgano. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedades autoinmunes y/o trastornos inflamatorios, tales como trastornos que tienen un componente proinflamatorio relacionado con IL-15 y neoplasias.

Los términos "enfermedades autoinmunes y/o trastornos inflamatorios" se definen generalmente aquí como enfermedades o trastornos que surgen de una respuesta inmunitaria anormal del cuerpo del sujeto contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo y anomalías inflamatorias que pueden implicar o no el sistema inmunitario, respectivamente. Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios incluyen principalmente artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca, en particular enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, inflamación enfermedad intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), hepatitis enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, respuesta de rechazo a trasplante, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila.

El término "neoplasias" incluye aquí principalmente la leucemia de linfocitos T, tal como linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares

(LDGL), leucemia linfocítica granular grande, y leucemia linfocítica aguda (ALL), pero también leucemia linfocítica pre-B, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomioma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma, neuroblastoma, y mesotelioma. Los términos "enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos" incluyen aquí principalmente infecciones granulomatosas (tales como tuberculosis, leishmaniasis, esquistosomiasis e infecciones por citomegalovirus) e infecciones por hantavirus (tales como fiebre hemorrágica por hantavirus con síndrome renal y síndrome pulmonar por hantavirus).

El término "enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC)" se refiere a trastornos caracterizados por una inflamación del SNC, en particular trastornos amiloideos. Ejemplos no limitativos de esos trastornos son enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

El término "enfermedades metabólicas" incluye principalmente diabetes, distrofia muscular y afecciones hipermetabólicas.

El término "afección hipermetabólica" incluye principalmente afecciones hereditarias tales como enfermedad de células falciformes o afecciones hipermetabólicas adquiridas tales como las relacionadas con traumatismo, infección o caquexia asociada con cáncer.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen seres humanos, primates, animales domésticos tales como ganado bovino, ganado ovino, cerdos, caballos, roedores de laboratorio y similares.

El término "eficacia" de un tratamiento o procedimiento según la invención puede medirse basándose en cambios en el transcurso de la enfermedad o afección en respuesta a un uso o un procedimiento según la invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento o procedimiento según la invención se puede medir por su impacto en los signos o síntomas de una enfermedad. Se logra una respuesta cuando el paciente experimenta alivio parcial o total, o reducción de los síntomas no deseados de la enfermedad. El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de al menos un anticuerpo según la invención, o una formulación farmacéutica del mismo, que provoca una reducción detectable de los síntomas de la enfermedad en un sujeto al que se está administrando dicho anticuerpo.

Anticuerpos anti-IL-15

Características generales de los anticuerpos que se unen a IL-15

En un primer aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-15, en particular IL-15 humana, o un fragmento de IL-15, y comprenden al menos una región variable de cadena pesada y/o al menos una región variable de cadena ligera de un anticuerpo como se describe aquí.

En una realización de la invención, se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a IL-15, más particularmente anticuerpos específicos para IL-15, en particular IL-15 humana, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera, y opcionalmente al menos un fragmento de una región constante, como se describe aquí. Generalmente, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo según la invención comprende CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3 y FW4 de las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de dicho anticuerpo.

En una realización, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo según la invención comprende los aminoácidos 26 a 111 de la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma, y/o los aminoácidos 24 a 102 de la SEQ ID NO: 24 o una variante de la misma.

La proteína a la que se unen los anticuerpos según la invención, o fragmentos de los mismos, puede ser la proteína IL-15 de cualquier especie. Los anticuerpos según la presente invención generalmente muestran una alta especificidad por la IL-15 humana. Sin embargo, dependiendo del grado de identidad de secuencia entre los homólogos de IL-15 de diferentes especies, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno dado puede mostrar reactividad cruzada con IL-15 de al menos otra especie, por ejemplo, mono (por ejemplo, mono *Cynomolgus*, macaco Rhesus), ratón, rata, títi, perro y/o conejo. Para los anticuerpos dirigidos hacia la IL-15 humana, puede ser deseable cierto nivel de reactividad cruzada con otras formas de IL-15 de mamífero en ciertas circunstancias, por ejemplo, cuando se ensayan anticuerpos en modelos animales de una enfermedad particular o para realizar estudios de toxicología, seguridad y dosificación. En una realización específica, los anticuerpos según la invención o fragmentos de los mismos se unen preferentemente a la IL-15 humana. En otra realización, los anticuerpos según la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos muestran reactividad cruzada con IL-15 humana, IL-15 de mono *Cynomolgus*, e IL-15 de macaco Rhesus. En aún una realización adicional, los anticuerpos según la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos no muestran reactividad cruzada con IL-15 de rata y/o IL-15 de ratón. En algunas realizaciones, la afinidad de unión (por ejemplo, inversamente correlacionada con el valor de K_D) de los anticuerpos, y fragmentos de los mismos, según la invención por IL-15 humana, es al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o al menos 1000 veces superior a su afinidad de unión por una IL-15 no humana, tal

como IL-15 de ratón o rata. En una realización, los anticuerpos según la invención o fragmentos de los mismos se unen preferentemente a IL-15 y, opcionalmente, muestran adicionalmente una unión débil, o prácticamente ninguna unión (es decir, unión insignificante o no detectable) a otras proteínas que tienen homología con IL-15 tal como IL-2, en particular IL-2 humana (SEQ ID NO: 38). En algunas realizaciones, la unión cuantitativa de anticuerpos y fragmentos de los mismos, según la invención por IL-15, es al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o al menos 1000 veces superior a su unión cuantitativa por IL-2. La afinidad de unión y/o la unión cuantitativa se pueden medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo diálisis de equilibrio, unión de equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia por plasmones superficiales o espectroscopia (por ejemplo, usando un ensayo de fluorescencia) (Jiang et al. BMC Pharmacology 2010, 10:10) y puede expresarse, por ejemplo, como tasa de asociación, tasa de disociación, constante de disociación de equilibrio (K_D), constante de equilibrio (K_{eq}) o cualquier otro término utilizado en la técnica.

En algunas realizaciones, los anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según la invención, se unen específicamente a IL-15 humana con una constante de disociación de equilibrio (K_D) igual o inferior a 100 nM, en particular inferior a 10 nM, más particularmente inferior a 1 nM, o inferior a 0,5 nM, o inferior a 0,1 nM, o inferior a 0,01 nM, o inferior a 0,005 nM.

En una realización particular, los anticuerpos según la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos inhiben la actividad de IL-15 y, opcionalmente, exhiben adicionalmente una actividad inhibitoria débil, o prácticamente ninguna actividad inhibitoria (es decir, actividad insignificante o no detectable) hacia otras proteínas que tienen homología con IL-15, tal como IL-2.

La capacidad de un anticuerpo para bloquear o neutralizar la actividad de su proteína diana se puede evaluar por su potencia como se define aquí, que se refleja, por ejemplo, por el valor de CI_{50} . Típicamente, la actividad neutralizante de un anticuerpo puede determinarse mediante ensayos *in vitro*, tal como un ensayo para medir el nivel de inhibición de la proliferación y/o supervivencia inducida por IL-15 de líneas celulares tales como células Kit 225 o M-07e, en presencia de dicho anticuerpo, como se describe en la sección de ejemplos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según la invención, tienen una CI_{50} igual o inferior a 200 nM, en particular inferior a 100 nM, en particular inferior a 50 nM, inferior a 30 nM, inferior a 20 nM, más particularmente inferior a 10 nM, inferior a 8 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM, inferior a 4 nM, inferior a 3 nM, inferior a 2 nM, inferior a 1 nM, inferior a 0,5 nM, inferior a 0,3 nM, inferior a 0,2 nM, inferior a 0,1 nM, inferior a 0,05 nM, o inferior a 0,03 nM, para inhibir la actividad de IL-15 tal como la proliferación y/o supervivencia inducida por IL-15 de líneas celulares tal como células Kit 225 o M-07e como se describe en la sección de ejemplos.

Se entiende que cualquier variante de un anticuerpo según la invención, o fragmento del mismo, que se describe aquí, puede unirse a IL-15 y opcionalmente neutralizar la actividad de IL-15. En una realización particular, dicha variante puede mostrar la misma afinidad de unión por IL-15 o incluso mayor, y/o la misma potencia o incluso mayor, y/o la misma selectividad de especie o mayor, y/o la misma selectividad por IL 15 o mayor, y/o la misma eficacia neutralizante o mayor, en comparación con el anticuerpo o fragmento parental del que deriva dicha variante.

En otra realización particular, los anticuerpos según la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos no impiden sustancialmente la unión de IL-15 a IL-15R α , es decir, la inhibición de la unión de IL-15 a IL-15R α en presencia de los anticuerpos según la invención es insignificante o no detectable.

Los anticuerpos según la invención pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y otros anticuerpos modificados genéticamente siempre que se conserven las propiedades características de los anticuerpos de la invención, en particular, la capacidad de unión al antígeno diana, más específicamente al mismo epítipo de IL-15 que el reconocido por los anticuerpos de la invención, y opcionalmente la capacidad de neutralizar la actividad de IL-15. En una realización particular de la invención, los anticuerpos contra IL-15 según la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a IL-15, son anticuerpos monoclonales.

En una realización particular adicional de la invención, los anticuerpos contra IL-15 según la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a IL-15, son anticuerpos humanizados. En una realización particular adicional de la invención, los anticuerpos contra IL-15 según la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a IL-15, son anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos contra IL-15 según la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a IL-15, pueden caracterizarse por su porción que interactúa con la proteína diana, en particular por su región variable, que típicamente comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera.

Características de los anticuerpos anti-IL-15 en relación con sus regiones variables

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une a IL-15 que comprende:

- (1) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o cualquier variante de la misma en la que 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente, y
 (2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 o cualquier variante de la misma en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente,

5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une a IL-15 que comprende:

10 (1) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o cualquier variante de la misma que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 5, y

(2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 o cualquier variante de la misma que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 24,

15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización más particular, el anticuerpo según la invención comprende:

20 (1) una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 97 % de identidad con la SEQ ID NO: 5, y

(2) una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 24, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización según la invención, dicha variante de SEQ ID NO: 5 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, excepto que al menos uno, en particular 1, 2, 3 o 4, de los aminoácidos:

25 (i) arginina (R) en la posición H3 (VH RH3), metionina (M) en la posición H5 (VH MH5), alanina (A) en la posición H6 (VH AH6), alanina (A) en la posición H49 (VH AH49), dentro de la región marco variable de cadena pesada, y/o

30 (ii) ácido aspártico (D) en la posición H61 (VH DH61), serina (S) en la posición H62 (VH SH62), dentro de la CDR2 de cadena pesada, y/o

(iii) metionina (M) en la posición H98 (VH MH98), triptófano (W) en la posición H100C (VH WH100C), metionina (M) en la posición H100E (VH MH100E), dentro de la CDR3 de cadena pesada, están sustituidos por un aminoácido diferente.

35 En aún una realización adicional, dicha variante de SEQ ID NO: 5 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, excepto que:

40 (i) VH RH3 está sustituido por glutamina (Q), y/o VH MH5 está sustituido por valina (V), y/o VH AH6 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o VH AH49 está sustituido por serina (S), y/o

(ii) VH DH61 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o VH SH62 está sustituido por treonina (T), y/o

(iii) VH MH98 está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), isoleucina (I) o alanina (A), y/o VH WH100C está sustituido por tirosina (Y), fenilalanina (F), o alanina (A), y/o VH MH100E está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), o isoleucina (I).

45 En una realización de la invención, dicha variante de SEQ ID NO: 24 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, excepto que al menos uno, en particular 1, 2, 3 o 4, de los aminoácidos:

50 (i) tirosina (Y) en la posición L36 (VL YL36), leucina (L) en la posición L46 (VL LL46), dentro de la región marco variable de cadena ligera, y/o

(ii) ácido aspártico (D) en la posición L91 (VL DL91), serina (S) en la posición L92 (VL SL92), dentro de la CDR3 de cadena ligera, están sustituidos por un aminoácido diferente.

55 En aún una realización adicional, dicha variante de SEQ ID NO: 24 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, excepto que:

(i) VL YL36 está sustituido por fenilalanina (F), y/o VL LL46 está sustituido por arginina (R), y/o

(ii) VL DL91 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o VL SL92 está sustituido por treonina (T).

60 En otra realización, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende:

(1) una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, excepto que:

65 (i) VH RH3 está sustituido por glutamina (Q), y/o VH MH5 está sustituido por valina (V), y/o VH AH6 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o

(ii) VH SH62 está sustituido por treonina (T), y/o

(iii) VH WH100C está sustituido por tirosina (Y), y

(2) una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

5 En una realización más particular, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende:

10 (i) una región variable de cadena pesada seleccionada de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, y

(ii) una región variable de cadena ligera seleccionada de: SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y SEQ ID NO: 29.

15 En una realización más particular, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6.

20 En una realización más particular, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24. Los ejemplos específicos de los anticuerpos según la invención incluyen los enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre de anticuerpo	Región VH	SEQ ID NO:	Región VL	SEQ ID NO:
huB-E29-1	huVH1	NO: 5	huVL1	NO: 24
huB-E29-2	huVH2	NO: 6	huVL1	NO: 24
huB-E29-3	huVH3	NO: 7	huVL1	NO: 24
huB-E29-4	huVH1	NO: 5	huVL2	NO: 25
huB-E29-5	huVH1	NO: 5	huVL3	NO: 26
huB-E29-6	huVH4	NO: 8	huVL1	NO: 24
huB-E29-7	huVH5	NO: 9	huVL1	NO: 24
huB-E29-8	huVH6	NO: 10	huVL1	NO: 24
huB-E29-9	huVH7	NO: 11	huVL1	NO: 24
huB-E29-10	huVH8	NO: 12	huVL1	NO: 24
huB-E29-11	huVH9	NO: 13	huVL1	NO: 24
huB-E29-12	huVH10	NO: 14	huVL1	NO: 24
huB-E29-13	huVH11	NO: 15	huVL1	NO: 24
huB-E29-14	huVH12	NO: 16	huVL1	NO: 24
huB-E29-15	huVH13	NO: 17	huVL1	NO: 24
huB-E29-16	huVH14	NO: 18	huVL1	NO: 24
huB-E29-17	huVH15	NO: 19	huVL1	NO: 24
huB-E29-18	huVH1	NO: 5	huVL4	NO: 27
huB-E29-19	huVH1	NO: 5	huVL5	NO: 28
huB-E29-22	huVH16	NO: 20	huVL6	NO: 29
huB-E29-24	huVH18	NO: 21	huVL1	NO: 24
huB-E29-30	huVH20	NO: 22	huVL1	NO: 24
huB-E29-31	huVH20	NO: 22	huVL6	NO: 29
huB-E29-34	huVH21	NO: 23	huVL6	NO: 29

En una realización más particular, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende:

- 5 (1) una región variable de cadena pesada seleccionada de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 21, y
(2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

10 Aún más particularmente, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

Aún más particularmente, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

15 Aún más particularmente, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

Aún más particularmente, el anticuerpo según la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

20 *Características de los anticuerpos anti-IL-15 en relación con su región constante*

Una porción correspondiente a una región constante de un anticuerpo está comprendida opcionalmente en los anticuerpos aislados que se unen a IL-15, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, según la invención.

25 Dependiendo de la función propuesta de los anticuerpos y, en particular, las funciones efectoras que pueden requerirse, una región constante de un anticuerpo puede estar presente o no en los anticuerpos según la invención.

30 Típicamente, cuando está presente en los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención, la región constante de cadena pesada, o una porción de la misma, puede ser de cualquier isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, la región constante de cadena pesada, o una porción de la misma, puede ser la de un anticuerpo seleccionado de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgM (por ejemplo, IgM1, IgM2). Puede ser, en particular, la región constante, o una porción de la misma, de una IgG, más particularmente la IgG1.

35 En particular, pueden usarse dominios de la región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Como alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, por ejemplo, para simplemente bloquear la actividad de IL-15.

40 Cuando está presente dentro de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención, la región constante de cadena ligera o una porción de la misma, puede ser de cualquier región constante de cadena ligera. Por ejemplo, la región constante de cadena ligera o una porción de la misma puede ser de la cadena ligera kappa o lambda.

45 En un aspecto particular de la invención, los anticuerpos para IL-15, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden (i) al menos una cadena pesada que comprende una región variable como se describe aquí, y una región constante o una porción de la misma de un anticuerpo IgG (en particular IgG1, más particularmente el alotipo G1m3, y (ii) al menos una cadena ligera que comprende una región variable como se describe aquí, y una región constante o una porción de la misma de una cadena ligera kappa (en particular el alotipo Km3). La secuencia de aminoácidos de la región constante del alotipo G1m3 es la SEQ ID NO: 30. La secuencia de aminoácidos de la región constante del alotipo Km3 es la SEQ ID NO: 31.

55 Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención tienen al menos un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, uno o dos sitios de unión a antígeno.

60 En algunas realizaciones, los anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención están glucosilados. Típicamente, los monosacáridos tales como N-acetilglucosamina, manosa, glucosa, galactosa, fucosa, ácido siálico, etc., se ensamblan en oligosacáridos en sitios de glucosilación individuales en el anticuerpo.

Conjugados que comprenden una molécula auxiliar

65 En otro aspecto de la invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según la invención se conjugan opcionalmente con una molécula accesoria, y después también se denominan en el presente documento "anticuerpos conjugados" o "fragmentos de anticuerpos conjugados".

La molécula accesoria puede conjugarse con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo directamente o a través de un espaciador de longitud adecuada, por ejemplo, como se describe en Kellogg et al. (2011, Bioconjug Chem, 22: 717-27).

En una realización, particularmente adaptada para fines terapéuticos, la molécula accesoria puede ser un grupo efector terapéutico tal como un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o un fragmento de la misma), citostático, o inmunomodulador, incluidos grupos radioactivos (es decir, grupos que comprenden un radionucleido o radioisótopo), o moléculas pequeñas.

En otra realización, la molécula accesoria comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que, cuando se conjuga con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención, forma un anticuerpo biespecífico. En particular, dicho anticuerpo biespecífico puede dirigirse a dos epítomos diferentes de IL-15 (definiendo así un anticuerpo biparatómico). Los anticuerpos conjugados y fragmentos de anticuerpos conjugados según la invención pueden dirigir el fármaco *in vivo* a un sitio de enfermedad (por ejemplo, un sitio de inflamación o un tumor) de modo que la molécula auxiliar conjugada pueda tener un efecto terapéutico en el sitio de la enfermedad.

En una realización alternativa, particularmente adaptada para fines de diagnóstico, la molécula accesoria puede ser, por ejemplo, un grupo marcador que incluye radioisótopos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²⁵I), etiquetas cromogénicas, por ejemplo, enzimas que se pueden usar para convertir un sustrato en un compuesto coloreado detectable (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa) o un compuesto fluorescente (por ejemplo, una proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente), etiquetas espectroscópicas (por ejemplo, etiquetas fluorescentes tal como fluoresceína y sus derivados como FITC, rojo de Texas, colorantes de cianina, fotociano, rodamina, o etiquetas que presentan un color visible), etiquetas luminiscentes incluyendo luciferinas, etiquetas de afinidad que pueden ser desarrolladas por un compuesto adicional específico para la etiqueta y que permiten una fácil detección y cuantificación, o cualquier otra etiqueta utilizada en ELISA estándar.

Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención

Según otra realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención.

El ácido nucleico aislado según la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN natural o un ADN, ARN o LNA recombinante o sintético, o una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico según la invención, ya sea en solitario o en combinación. En una realización particular, las moléculas de ácido nucleico según la invención son ADNc.

En una realización particular, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una o más de:

(1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o cualquier variante de la misma, en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

(2) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 o cualquier variante de la misma, en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización particular, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una o más de:

(1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o cualquier variante de la misma que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 5, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

(2) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 o cualquier variante de la misma que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 24, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización particular, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una o más de:

(1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada seleccionada de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

(2) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera seleccionada de: SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, y SEQ ID NO: 29, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización más particular, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende uno o más de:

(1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada seleccionada de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 21, y

(2) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

Vectores y células huésped para la producción y purificación de los polipéptidos de la invención

En una realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención, en el que el vector opcionalmente comprende una secuencia de control de expresión, que permite la expresión en células huésped procariontas o eucariotas del polipéptido codificado, unidas operativamente a dicha molécula de ácido nucleico.

Se pueden usar numerosos sistemas de expresión, incluyendo, sin limitación, cromosomas, episomas y virus derivados. Más particularmente, los vectores recombinantes utilizados pueden derivarse de plásmidos bacterianos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos de cromosomas de levadura, virus tales como baculovirus, virus del papiloma tal como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela del zorro, virus de la pseudorrabia, retrovirus. Estos vectores recombinantes pueden derivarse igualmente de derivados de cósmidos o fagémidos.

La secuencia de ácido nucleico se puede insertar en el vector recombinante por procedimientos bien conocidos por un experto en la técnica, tales como, por ejemplo, los que se describen en MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al., 4ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

El vector recombinante puede incluir secuencias de nucleótidos que controlan la regulación de la expresión de polinucleótidos, así como secuencias de nucleótidos que permiten la expresión y la transcripción de un polinucleótido de la invención y la traducción de un polipéptido de la invención, seleccionándose estas secuencias según a las células huésped que se utilizan.

Por lo tanto, por ejemplo, se puede integrar una señal de secreción apropiada en el vector recombinante para que el polipéptido, codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención, se dirija hacia el lumen del retículo endoplásmico, hacia el espacio periplásmico, en la membrana o hacia el entorno extracelular. La elección de una señal de secreción apropiada puede facilitar la posterior purificación de proteínas. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende un vector recombinante según la invención.

La introducción del vector recombinante en una célula huésped puede realizarse según procedimientos que se conocen bien por un experto en la técnica, tales como los descritos en BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 2ª ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, y MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, anteriormente, tal como transfección por fosfato de calcio, transfección por DEAE dextrano, transfección, microinyección, transfección por lípidos catiónicos, electroporación, transducción o infección.

La célula huésped puede ser, por ejemplo, células bacterianas tales como *Escherichia coli* o *Streptomyces*, células de hongos tal como *Aspergillus*, y levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insectos, células de ovario de hámster chino (CHO), línea celular de ratón C127, línea celular BHK de células de hámster sirio, células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293). En una realización particular, la célula huésped es una célula CHO o una célula HEK 293.

Las células huésped pueden usarse, por ejemplo, para expresar un polipéptido de la invención. Después de la purificación por procedimientos estándar, el polipéptido de la invención puede usarse en un procedimiento descrito posteriormente en el presente documento.

Por ejemplo, cuando se emplean sistemas de expresión que secretan la proteína recombinante, el medio de cultivo puede concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como una matriz de filtración en gel. Como alternativa, se puede emplear un intercambio aniónico y/o una resina de afinidad. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos para purificar adicionalmente los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, se conocen bien y pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante sustancialmente homogénea. La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse mediante la alteración inicial de las células huésped, la centrifugación, la extracción de los gránulos celulares si se trata de un polipéptido insoluble, o del líquido sobrenadante si se trata de un polipéptido soluble, seguida de una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico, purificación por afinidad o cromatografía de exclusión por tamaño. Las células microbianas pueden interrumpirse por cualquier procedimiento conveniente, incluido el ciclo de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o el uso de agentes de lisis celular.

En otra realización, la invención proporciona un proceso para producir células capaces de expresar un polipéptido según la invención, que comprende células genéticamente modificadas con un vector de expresión recombinante o un ácido nucleico según la invención. En otra realización, la invención proporciona un proceso para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleica que codifica dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos en condiciones suficientes para promover la expresión de dichos polipéptidos. El anticuerpo o fragmento del mismo según la invención se recupera a continuación del medio de cultivo o extractos celulares, dependiendo del sistema de expresión empleado. Como sabe el experto en la técnica, los procedimientos para purificar una proteína recombinante variarán según factores tales como el tipo de células huésped empleadas y si la proteína recombinante se secreta o no en el medio de cultivo como se ha descrito anteriormente.

Composiciones

La invención proporciona agentes farmacéuticos o terapéuticos como composiciones útiles para tratar a un paciente, preferiblemente un paciente mamífero, y mucho más preferiblemente un paciente humano que padece un trastorno médico, y en particular una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15, tal como una enfermedad autoinmune y/o trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo al trasplante, un afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos. Como alternativa, la invención proporciona agentes útiles para prevenir un trastorno médico, y en particular una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 tal como una enfermedad autoinmune y/o trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo al trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de: (i) un anticuerpo que se une a IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención, (ii) un ácido nucleico según la invención, (iii) un vector según la invención, y/o (iv) una célula huésped según la invención, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener uno o más anticuerpos que se unen a IL-15 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en cualquier forma descrita en el presente documento. Las composiciones de esta invención pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como alumbre, estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes saporíferos, adyuvantes y similares.

Los compuestos de la invención, junto con un adyuvante, vehículo, diluyente o excipiente empleado convencionalmente, pueden colocarse en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de los mismos, y en dicha forma pueden emplearse como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas cargadas, formas liofilizadas, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas cargadas con los mismos, todo para su uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluso subcutáneo). Dichas composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias de las mismas comprenden ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo proporcional al intervalo de dosis diaria prevista que se va a emplear. Las composiciones de esta invención pueden ser formulaciones líquidas incluyendo, pero sin limitación, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Las formas líquidas adecuadas para administración vía oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispersantes, colorantes, saporíferos, y similares. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. El agente de suspensión incluye, pero sin limitación, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen, pero sin limitación, lecitina, monooleato de sorbitán y goma arábiga. Los vehículos no acuosos incluyen, pero sin limitación, aceites comestibles, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleicos, propilenglicol y alcohol etílico. Los conservantes incluyen, pero sin limitación, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. Otros materiales, así como técnicas de procesamiento y similares, se exponen en la Parte 5 de Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 22ª Edición, 2012, Pharmaceutical Press and the University of the Sciences, Philadelphia College of Pharmacy. Las composiciones sólidas de esta invención pueden estar en forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, incluyendo, pero sin limitación, agentes de unión, cargas, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes de unión incluyen, pero sin limitación, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen, pero sin limitación, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato de almidón sódico. Los agentes humectantes incluyen, pero sin limitación, laurilsulfato sódico. Los comprimidos pueden estar recubiertos según los procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones inyectables se basan típicamente en una solución salina estéril inyectable o una solución salina tamponada con fosfato, u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica.

5 Las composiciones de esta invención también se pueden formular como formulaciones transdérmicas que comprenden vehículos acuosos o no acuosos incluyendo, pero sin limitación, cremas, ungüentos, lociones, pastas, yeso medicinal, parche o membrana.

10 Las composiciones de esta invención también se pueden formular para administración parenteral incluyendo, pero sin limitación, mediante inyección o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilizantes y dispersantes. La composición también se puede proporcionar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado incluyendo, pero sin limitación, agua estéril apirógena.

15 Las composiciones de esta invención también se pueden formular como una preparación de liberación lenta, que se puede administrar por implante o mediante inyección intramuscular. Las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (como una emulsión en un aceite aceptable, por ejemplo) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (como una sal moderadamente soluble, por ejemplo).

20 Los compuestos de esta invención también se pueden administrar en formas de liberación sostenida o de sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida. Se puede encontrar también una descripción de materiales de liberación prolongada representativos en los materiales incorporados en *Remington's*

Pharmaceutical Sciences.

25 Las formulaciones inyectables son particularmente apropiadas para administrar las composiciones según la invención.

30 En otra realización, la invención proporciona una composición de imagen o composición de diagnóstico que comprende una IL-15 de unión a anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe aquí.

35 La composición de formación de imagen o la composición de diagnóstico según la invención es útil para detectar niveles elevados de IL-15 asociados con una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo al trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

Combinación

40 Según la invención, un anticuerpo que se une a IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención puede administrarse en solitario o en combinación con un coagente útil en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, por ejemplo, fármacos inmunomoduladores, incluidos productos biológicos, moléculas pequeñas y vacunas.

45 Como alternativa, un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención puede administrarse o en combinación con un coagente útil en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, un fármaco anticanceroso tal como fármacos citotóxicos, los inhibidores de tirosina cinasa imatinib (Gleevec/Glivec) o gefitinib (Iressa), y anticuerpos terapéuticos tales como trastuzumab (Herceptina) o el anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan).

50 Según la invención, el anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede administrarse a un individuo antes de, simultánea o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o coagentes útiles en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15, tal como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, en una cantidad terapéuticamente eficaz. El anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención que se administra simultáneamente con dichos coagentes se puede administrar en las mismas o diferentes composiciones y en las mismas o diferentes vías de administración.

60 En una realización particular, un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención puede administrarse en combinación con un compuesto que reduce la inflamación intestinal, y/o protege la mucosa intestinal, y/o reduce la inmunorreactividad de péptidos de gluten, y/o modifica la microbiota intestinal para el tratamiento de sujetos que padecen enfermedad celíaca.

65 En una realización particular, un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención puede administrarse en combinación con un compuesto que reduce la inflamación intestinal, y/o protege la mucosa intestinal, y/o reduce la inmunorreactividad de péptidos de gluten, y/o modifica la microbiota intestinal para el tratamiento de sujetos que padecen enfermedad celíaca refractaria.

Modo de administración

5 Las composiciones de esta invención pueden administrarse de cualquier manera incluyendo, pero sin limitación, por vía oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosa, tópica, por inhalación, por administración bucal o intranasal, o intravejiga, o combinaciones de las mismas.

10 La administración parenteral incluye, pero sin limitación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. Las composiciones de esta invención también se pueden administrar en forma de un implante, que permite la liberación lenta de las composiciones, así como una infusión i.v. controlada lentamente.

15 En una realización particular, un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se administra por vía sistémica o local. En una realización particular, un anticuerpo para IL-15 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se administra por vía subcutánea o intravenosa.

20 La dosis administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la magnitud de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado.

25 Típicamente, las cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo farmacéuticamente activo varían de una dosis de 0,5 mg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal. Si el régimen es una infusión continua, puede estar en el intervalo de 0,250 mg/kg hasta 13 mg/kg de peso corporal.

Pacientes

30 En una realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15, tal como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio que incluye artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca tal como enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, inflamación enfermedad intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), hepatitis enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, respuesta de rechazo a trasplante, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila y afecciones metabólicas tales como afecciones hipermetabólicas. En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una enfermedad celíaca.

35 En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen enfermedad celíaca refractaria.

40 En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen esofagitis eosinófila.

En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen hepatitis autoinmune.

45 En otra realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una neoplasia incluyendo leucemia linfocítica T, tal como linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares (LDGL), leucemia linfocítica granular grande, y leucemia linfocítica aguda ALL), leucemia linfocítica pre-B, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma, neuroblastoma, y mesotelioma.

50 En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen leucemia linfocítica granular grande.

En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen leucemia linfocítica aguda.

55 En otra realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen un rechazo a trasplante.

En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

60 En una realización particular, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una enfermedad infecciosa causada por hantavirus tal como fiebre hemorrágica por hantavirus con síndrome renal y/o síndrome pulmonar por hantavirus.

65 En aún otra realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen una afección hipermetabólica incluyendo enfermedad de células falciformes y caquexia asociada al cáncer.

En aún otra realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del

sistema nervioso central.

En aún otra realización, los pacientes según la invención son pacientes que padecen trastornos amiloides tal como enfermedad de Alzheimer.

5

Usos y procedimientos según la invención

El anticuerpo que se une a IL-15 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, los ácidos nucleicos, los vectores, las células huésped, las composiciones según la invención son para su uso en el diagnóstico, prevención o tratamiento de trastornos asociados con, causados por, o acompañados de niveles elevados de IL-15 y/o actividad elevada de IL-15.

10

En una realización, se proporciona un anticuerpo contra IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para su uso como un medicamento.

15

Otra realización proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 tal como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, en particular artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca, tal como enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, inflamación enfermedad intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), hepatitis enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, respuesta de rechazo a trasplante, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila.

20

Otra realización proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una neoplasia, en particular leucemia linfocítica T, tal como linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares (LDGL), leucemia linfocítica granular grande, y leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica pre-B, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma, neuroblastoma, y mesotelioma.

25

30

Aún otra realización proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de rechazo a trasplante, una afección metabólica (tal como una afección hipermetabólica) y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

35

En una realización se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 tal como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, en particular artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca, tal como enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, inflamación enfermedad intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), hepatitis enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila.

40

En una realización específica se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar enfermedad celíaca, en particular enfermedad celíaca refractaria.

45

En una realización particular, se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar esofagitis eosinófila.

50

En una realización particular, se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar hepatitis autoinmune.

55

En una realización se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una neoplasia, en particular

60

leucemia linfocítica T tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica granular grande, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), y trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares (LDGL), leucemia linfocítica pre-B, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma, neuroblastoma, y/o mesotelioma.

65

En una realización alternativa se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar leucemia linfocítica granular grande.

- 5 En una realización alternativa se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar leucemia linfocítica aguda.
- 10 En una realización específica se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.
- 15 En una realización específica se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar infecciones por hantavirus.
- 20 En una realización específica se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central.
- 25 En una realización específica se proporciona un uso de un anticuerpo para IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.
- 30 En otra realización se proporcionan agentes útiles para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 tal como una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, en particular artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca, en particular enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, inflamación enfermedad intestinal (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), hepatitis enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila.
- 35 En una realización particular se proporcionan agentes útiles para prevenir y/o tratar una enfermedad celíaca.
- 40 En una realización alternativa se proporcionan agentes útiles para prevenir y/o tratar una neoplasia, en particular leucemia linfocítica T, tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica granular grande, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoide, síndrome de Sezary), y trastorno linfoproliferativo de linfocitos granulares (LDGL), leucemia linfocítica pre-B, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma, neuroblastoma, y/o mesotelioma.
- 45 En una realización particular se proporcionan agentes útiles para prevenir y/o tratar leucemia linfocítica granular grande.
- 50 En otra realización se proporcionan agentes útiles para prevenir y/o tratar rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.
- 55 En una realización alternativa se proporciona un procedimiento para detectar IL-15 en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo contra IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención.
- 60 Como se usa en el presente documento, "muestra biológica" se refiere a células, muestras tisulares o componentes celulares (tales como membranas celulares o componentes celulares) obtenidos de un sujeto, en particular de un sujeto que se sospecha que tiene, o que padece, una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, o con alto riesgo de desarrollar tal trastorno.
- 65 Los ejemplos de muestra biológica incluyen sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y muestras tisulares que incluyen células aisladas de dicho tejido. Las muestras tisulares incluyen secciones tisulares fijadas con formalina o congeladas.
- Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para la detección y análisis de IL-15, incluyendo técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos o indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas.
- En una realización particular, la invención proporciona un procedimiento *ex vivo* para detectar la presencia y/o concentración de la proteína IL-15 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- (i) Proporcionar una muestra biológica de un sujeto,
(ii) Hacer reaccionar dicha muestra biológica con al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

mismo según la invención, en condiciones suficientes para unir la proteína IL-15 presente en dicha muestra biológica a dicho al menos un anticuerpo o fragmento del mismo a través de interacciones antígeno-anticuerpo; y (iii) Detectar una señal proporcional al nivel de complejo de antígeno-anticuerpo formado en la etapa (ii),

5 en el que la intensidad de la señal se correlaciona con la concentración de proteína IL-15 en la muestra biológica.

Más particularmente, se proporciona un procedimiento *ex vivo* de pronóstico o diagnóstico de una enfermedad autoinmune y/o trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, asociado con un nivel elevado de IL-15 de una muestra biológica de un sujeto que comprende las etapas de:

- (a) Proporcionar una muestra biológica de un sujeto;
Poner dicha muestra biológica en contacto con una matriz sólida donde se une al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención, en la que el contacto es en condiciones suficientes para unir la proteína IL-15 presente en dicha muestra de fluido biológico a dicho al menos un anticuerpo o fragmento del mismo a través de interacciones antígeno-anticuerpo;
- (c) Eliminar cualquier proteína IL-15 no unida de la superficie de dicha matriz sólida;
- (d) Detectar una señal proporcional al nivel del complejo antígeno-anticuerpo unido a dicha matriz sólida,
- (e) Comparar el nivel de señal detectado en la etapa (d) con el nivel de señal detectado en las mismas condiciones con un control negativo,

en el que un nivel de señal detectado en la muestra del sujeto que es superior al nivel de señal detectado en el control negativo es indicativo de un nivel elevado de IL-15 asociado con una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.

Kit

Un aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención, y/o al menos un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento del mismo, y/o al menos un vector recombinante que comprende dicho ácido nucleico, y/o al menos una célula huésped según la invención, y opcionalmente material instructivo.

En una realización particular, el kit según la invención comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención, a acoplar o ya acoplado a una matriz sólida.

Los ejemplos de matriz sólida adecuados para la invención incluyen cualquier soporte de fase sólida adecuado para realizar un inmunoensayo o un procedimiento según la invención, tal como perlas, micropartículas, nanopartículas, tubos, tejidos o placas, películas, portaobjetos, pocillos, formados a partir de o recubiertos con vidrio, poliestireno, polipropileno, nitrocelulosa, cuarzo, cerámica, dextrano u otros materiales. Por ejemplo, la matriz sólida está en forma de pocillos de microtitulación, tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos.

La fijación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención a la matriz sólida en un kit según la invención puede realizarse mediante adsorción o acoplamiento químico a un soporte de fase sólida. Se puede usar cualquier medio conocido en la técnica para inmovilizar una proteína o péptido en un soporte sólido. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención pueden unirse covalentemente o no covalentemente a la matriz sólida mediante técnicas tales como la unión covalente a través de un enlace de amida o éster o adsorción. Los péptidos pueden unirse usando pares de unión tales como biotina y avidina o anticuerpo y antígeno. Después de que los péptidos se fijan a la matriz sólida, la matriz sólida se puede incubar con una solución de bloqueo (que contiene una proteína de bloqueo tal como albúmina sérica bovina) para reducir la adsorción no específica de anticuerpos en una muestra de prueba con respecto a la superficie de soporte. Según un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la invención pueden sintetizarse directamente sobre la matriz sólida del kit de la invención.

Según una realización, cuando el kit comprende al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención o una combinación de los mismos para el acoplamiento a una matriz sólida como soporte de fase sólida, el kit comprende además opcionalmente reactivos de acoplamiento y/o una matriz sólida para realizar un inmunoensayo.

Según otra realización adicional, el kit según la invención comprende además al menos un reactivo de aclarado para lavar el material no unido antes de la detección para evitar la detección de ruido de fondo. Típicamente, los reactivos de aclarado comprenden tampones estándar conocidos en la técnica.

Habiéndose descrito la invención, los siguientes ejemplos se presentan a título de ilustración y no de limitación.

EJEMPLOS

65

Ejemplo 1. Generación y aislamiento de los anticuerpos anti-IL-15 según la invención

1. Producción y secuenciación de B-E29 de ratón

Los anticuerpos según la invención derivan del anticuerpo B-E29 de ratón disponible comercialmente, también descrito en *Bernard et al., 2004*, anteriormente, en el presente documento en referencia al anticuerpo comparativo 1. Brevemente, los anticuerpos monoclonales de ratón, específicos para IL-15 humana, se generan originalmente inmunizando ratones BALB/c con IL-15 humana recombinante hecha en *E. coli* (Peprotech 200-15). Los bazo de ratones inmunizados se fusionan con la línea celular de mieloma de ratón X6.3.AG.8653 y el hibridoma generado usando técnicas convencionales. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para determinar la presencia de anticuerpos de unión a IL-15 usando una técnica ELISA, seguido de dilución de clonación y determinación de isotipo. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-15 B-E29, de los isotipos IgG1 (cadena pesada) κ (cadena ligera), se seleccionó utilizando esta metodología, así como otros anticuerpos anti-IL-15. Sin embargo, cuando se ensayó la inhibición de la proliferación de linfocitos T Kit 225 estimulados con IL-15 recombinante, solo el anticuerpo B-E29 pudo bloquear esta actividad, por lo que B-E29 neutraliza la actividad biológica de IL-15 mientras que otros anticuerpos anti-IL-15 no (datos no mostrados).

El dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo B-E29 de ratón se secuenciaron usando protocolos estándar. Brevemente, el ARN mensajero (ARNm) se extrajo de los gránulos de células de hibridoma B-E29 usando protocolos convencionales de extracción y purificación de ARN. El ADNc se creó a partir del ARN mediante transcripción inversa con un cebador oligo(dT). Las regiones VH y VL del ADN del anticuerpo monoclonal se amplificaron mediante reacciones de PCR. Los productos VH y VL se clonaron en el vector de secuenciación Invitrogen pCR2.1, se transformaron en células TOP10 y se cribaron para determinar los transformantes positivos por PCR. Las colonias seleccionadas se recogieron y se analizaron a través de secuenciación. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-E29 de ratón se proporciona como SEQ ID NO: 32. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera kappa (VL) del anticuerpo B-E29 de ratón se proporciona como SEQ ID NO: 36.

2. Humanización de anticuerpos anti-IL-15 derivados de B-E29 de ratón

Utilizando sistemas de numeración de anticuerpos del IMGT (sistema de información internacional ImMunoGeneTics para inmunoglobulinas o anticuerpos) y Kabat, se identificaron los marcos y las CDR del anticuerpo B-E29 de ratón. Se realizaron búsquedas en bases de datos en línea de secuencias de IgG humana para comparar los dominios de ratón utilizando algoritmos de búsqueda BLAST, y marcos de dominios variables humanos seleccionados de los 100 mejores resultados de BLAST. Estos se redujeron basándose en una combinación de homología de marco, manteniendo residuos clave de marco y estructura de bucle canónica. Se construyeron varios anticuerpos humanizados, quiméricos y combinatorios, entre los cuales algunos tenían mutaciones en residuos inusuales situados en la porción N-terminal de la región VH de ratón, con el objetivo de seleccionar las "mejores" cadenas VH y VL humanas para formar anticuerpos que retuvieran o aumentaran su capacidad de unión a IL-15, así como retuvieran o aumentaran la eficiencia de su producción, en comparación con el anticuerpo B-E29 de ratón (anticuerpo comparativo 1).

En la Figura 1 (A) se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes variantes humanizadas y quiméricas del dominio variable de cadena pesada de B-E29 de ratón. En la Figura 1 (B) se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes variantes humanizadas y quiméricas del dominio variable de cadena ligera de B-E29 de ratón. El dominio VH de cada una de las variantes mencionadas anteriormente se sintetizó en marco con una secuencia de dominio constante de isotipo IgG1 humano (alotipo G1m3) de SEQ ID NO: 30. El dominio VL de cada una de las variantes mencionadas anteriormente se sintetizó en marco con una secuencia de dominio constante de isotipo IgK humano (alotipo Km3) de SEQ ID NO: 31. Tanto la secuencia codificante de cadena pesada como de cadena ligera se clonaron en el esqueleto del vector pVITRO-DHFR3 para la producción de anticuerpos. Los plásmidos se cotransfectaron en células CHO (ovario de hámster chino) adaptadas a la suspensión (células CHO-S, Invitrogen, RU). Después de 7 días, se recogió el sobrenadante de cultivo y se purificaron los anticuerpos usando un sistema de cromatografía AKTA de Amersham Biosciences y una columna de proteína A HiTrap.

Las combinaciones cVH3:cVK1 y cVH4:cVK1 no dieron como resultado una producción de anticuerpos suficiente para ensayarse adicionalmente. En un ensayo ELISA, las combinaciones cVH1:cVK1, hVH1:cVK1, cVH1:hVK1 mostraron una unión similar a la IL-15 humana, mejor que la observada con hVH1:hVK2 y cVH1:hVK2 (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran que entre las variantes ensayadas, hVH1 y hVK1 son buenas candidatas para formar anticuerpos que pueden producirse de manera eficiente y que se unen a IL-15. Por lo tanto, se utilizaron como material de partida para una mayor optimización.

3. Optimización de anticuerpos anti-IL-15 humanizados

La optimización consistió en cambiar algunos aminoácidos o motivos de aminoácidos dentro de las CDR y/o los marcos de hVH1 (también llamada "huVH1" aquí) y hVK1 (también llamada "huVL1" aquí), lo que podría conducir a

inestabilidad química o agregación de anticuerpos, así como retener o aumentar la eficiencia de su producción en comparación con el anticuerpo B-E29 de ratón (anticuerpo comparativo 1). Esta estrategia permitió la generación de variantes de anticuerpos huVH1/huVL1 que comprendían las regiones VH/VL indicadas en la Tabla 1 anterior.

5 El dominio VH de cada una de las variantes indicadas en la Tabla 1 se sintetizó en marco con una secuencia de dominio constante de isotipo IgG1 humano (alotipo G1m3) de SEQ ID NO: 30.

El dominio VL de cada una de las variantes indicadas en la Tabla 1 se sintetizó en marco con una secuencia de dominio constante de isotipo IgK humano (alotipo Km3) de SEQ ID NO: 31.

10 Se produjeron anticuerpos recombinantes en un sistema CHO transitorio y se ensayaron adicionalmente como sobrenadantes de cultivo o después de la purificación a través de una columna FPLC de proteína-A.

15 Ejemplo 2. Potencia de unión de diversos anticuerpos anti-IL-15 según la invención para IL-15

Algunos de los anticuerpos según la presente invención se ensayaron para determinar su capacidad para unir IL-15 humana o de mono recombinante unida a placa en un ensayo ELISA. El anticuerpo completamente humano de la técnica anterior (146B7 descrito en el documento WO 03/017935, en el presente documento denominado anticuerpo comparativo 2) se produjo en el mismo sistema de expresión, se purificó y se usó como control.

20 Las placas Maxisorp se revistieron con IL-15 humana recombinante (Prospec cat. n.º CYT230) o IL-15 de macaco Rhesus (MyBiosource cat. n.º MBS948894) a 100 ng/pocillo en tampón de revestimiento de carbonato durante 2 horas a 37 °C. Dado que las secuencias publicadas de IL-15 de macaco rhesus y mono *Cynomolgus* son idénticas, dicha proteína IL-15 recombinante se denominó IL-15 de mono macaco. La proteína recombinante IL-15 humana ensayada tiene una secuencia idéntica a la proporcionada en la SEQ ID NO: 1 pero con una metionina adicional en la posición N-terminal como se hace usualmente para expresar proteínas recombinantes en *E. Coli*. La IL-15 de mono macaco recombinante ensayada se produjo en levadura y tiene una secuencia idéntica a la proporcionada en la SEQ ID NO: 4 pero con una etiqueta His N-terminal adicional.

30 A continuación, la placa se bloqueó con suero de cabra normal al 2 % durante 30 min a 37 °C y se lavó 6 veces con PBS-Tween (Tween-20 al 0,05 % en PBS, v/v). Los anticuerpos de prueba se añadieron a la placa por triplicado a diversas diluciones en PBS-Tween, y la placa se incubó con balanceo suave a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la placa se lavó 6 veces con PBS-Tween y se añadió a la placa una dilución apropiada de anticuerpo anti-IgG humana de cabra (Millipore cat. n.º AP309P) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se dejó balanceándose a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la placa se lavó 6 veces con PBS-Tween y se incubó con sustrato TMB. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M y se leyó a 450 nm. Las curvas de respuesta a la dosis de absorbancia frente a la concentración se representaron y se analizaron para determinar las concentraciones de unión media máxima (BC₅₀) utilizando el software Graphpad Prism. Los valores de BC₅₀ expresados como molaridad se extrapolaron de la concentración en ng/ml usando un valor de peso molecular de 150 kDa para todos los anticuerpos.

Los valores representativos de BC₅₀ obtenidos para varias variantes humanizadas de B-E29, así como el anticuerpo 146B7 completamente humano usado como control, se indican en la Tabla 2.

45

Tabla 2

Anticuerpo	BC ₅₀ de IL-15 humana (nM)	BC ₅₀ de IL-15 de mono macaco (nM)
146B7 (anticuerpo comparativo 2)	8,407	0,733
huB-E29-1	1,333	0,487
huB-E29-2	1,467	0,340
huB-E29-3	2,620	NT
huB-E29-4	1,013	0,500
huB-E29-5	1,473	0,453
huB-E29-6	1,840	NT

(continuación)

Anticuerpo	BC ₅₀ de IL-15 humana (nM)	BC ₅₀ de IL-15 de mono macaco (nM)
huB-E29-7	0,840	0,433
huB-E29-8	1,787	NT
huB-E29-9	1,987	NT
huB-E29-10	0,507	0,353
huB-E29-11	0,980	NT
huB-E29-12	0,593	NT
huB-E29-13	3,173	NT
huB-E29-14	0,813	0,347
huB-E29-15	2,533	NT
huB-E29-16	2,007	NT
huB-E29-17	2,613	NT
huB-E29-18	0,693	0,367
huB-E29-19	2,207	NT
huB-E29-22	3,867	NT
huB-E29-24	0,647	0,113
huB-E29-30	5,867	NT
huB-E29-31	3,514	NT
huB-E29-34	3,887	NT
NT: no ensayado		

5 Como se muestra en la Tabla 2, mientras que algunas variantes de anticuerpos según la invención tenían una actividad de unión comparable entre sí, otras mostraron una unión mejorada a la IL-15 humana (por ejemplo, huB-E29-10 y huB-E29-24). La figura 2A muestra que una variante de B-E29 humanizada representativa (huB-E29-1) muestra no solo una mejor potencia en la unión a la IL-15 humana que el anticuerpo 146B7, sino también una señal máxima más alta que sugiere que la eficacia en la unión de la IL-15 se ha mejorado. Esta capacidad mejorada para unirse a IL-15 humana se confirma adicionalmente en el ejemplo 3, Tabla 3.

10 En los casos en los que se probó la unión a IL-15 de mono macaco, todas las variantes de anticuerpos según la invención que se unen a IL-15 humana también se unen a la IL-15 de mono macaco, con una potencia ligeramente más alta.

15 **Ejemplo 3. Cinética de unión y afinidad por la IL-15 humana con algunos de los anticuerpos anti-IL-15 según la invención**

20 La tasa de asociación (k_a), la tasa de disociación (k_d) y la constante de disociación de equilibrio (K_D) de tres variantes de anticuerpo B-E29 humanizados según la invención hacia IL-15 humana recombinante se determinaron por resonancia por plasmones superficiales (SPR). Se inmovilizó IL-15 humana (Prospec cat n.º CYT230) en un chip CM5 (GE Healthcare) usando acoplamiento de amina estándar, y se inyectaron anticuerpos a diversas concentraciones en 120 μ l de solución salina tamponada con fosfato con un caudal de 40 μ l/ml. La cinética de unión se analizó en un aparato Biacore 3000 (GE Healthcare) con un período de disociación de 300 segundos. La señal de referencia y la señal de concentración de anticuerpo 0 nM se restaron y los datos se ajustaron usando un modelo de unión 1:1 (Langmuir).

25

Tabla 3

Anticuerpo	k_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	Rmáx (UR)
huB-E29-2	$1,15 \times 10^6$	$1,07 \times 10^{-5}$	9,4	214
huB-E29-10	$1,43 \times 10^6$	$4,23 \times 10^{-4}$	295	212
huB-E29-24	$1,75 \times 10^6$	$5,74 \times 10^{-4}$	329	167
146B7 (anticuerpo comparativo 2)	$1,44 \times 10^6$	$5,26 \times 10^{-5}$	36,7	57,3
UR: Unidades relativas				

5 Mientras que la tasa de asociación (k_a) de todos los anticuerpos B-E29 humanizados comparados fue similar, la tasa de disociación (k_d) de huB-E29-2 fue más lenta, dando como resultado una constante de disociación de equilibrio K_D inferior (Tabla 3). El anticuerpo 146B7 también mostró una K_D baja, similar a la informada (Villadsen, et al., 2003, J. Clin. Invest. 112:1571-1580). Sin embargo, la señal máxima (Rmáx) dada por la asociación de 146B7 en un chip recubierto con IL-15 humana fue mucho menor que la observada con las tres variantes de anticuerpo B-E29 humanizadas. Este resultado es similar al observado por ELISA en el ejemplo 2 y sugiere que estas tres variantes de anticuerpo B-E29 humanizadas tienen una capacidad de unión mejorada a la IL-15 humana, en comparación con el anticuerpo 146B7.

15 Ejemplo 4. Especificidad de especie de algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

15 Los anticuerpos según la presente invención se ensayaron para determinar su capacidad para unir IL-15 de rata o ratón recombinante unida a placa en un ensayo ELISA.

20 Las placas Maxisorp se revistieron con IL-15 de ratón recombinante (R&D Systems cat. n.º 447-ML) o IL-15 de rata (Sigma cat. n.º SRP4172) a 100 ng/pocillo en tampón de recubrimiento de carbonato durante 2 horas a 37 °C. Las proteínas recombinantes IL-15 ensayadas tienen una secuencia idéntica a la proporcionada en la SEQ ID NO: 2 (IL-15 de ratón) y la SEQ ID NO: 3 (IL-15 de rata) pero con una metionina adicional en la posición N-terminal como se hace usualmente para expresar proteínas recombinantes en *E. Coli*.

25 A continuación, la placa se bloqueó con suero de cabra normal al 2 % durante 30 min a 37 °C y se lavó 6 veces con PBS-Tween (Tween-20 al 0,05 % en PBS, v/v). Los anticuerpos de prueba se añadieron a la placa por triplicado a diversas diluciones en PBS-Tween, y la placa se incubó con balanceo suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Como controles positivos, se ensayaron anticuerpos de conejo anti-IL-15 de ratón (Acris cat. n.º AP01124PU-S) o IL-15 de conejo anti-rata (Biovision cat. n.º 5172) a las mismas concentraciones. A continuación, la placa se lavó 6 veces con PBS-Tween y se añadió una dilución apropiada de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (Millipore cat. n.º AP309P) para anticuerpos humanizados, o anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (Sigma cat. n.º A 4416) para los controles positivos, y la placa se dejó balanceándose a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la placa se lavó 6 veces con PBS-Tween y se incubó con sustrato TMB. La reacción se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 1 M y se leyó a 450 nm. Las curvas de respuesta a la dosis de absorbancia frente a la concentración se representaron usando el software Graphpad Prism.

35 Como se muestra en la figura 2B y la figura 2C, ninguna de las variantes humanizadas ensayadas de B-E29 mostró una unión significativa, a las concentraciones ensayadas, a IL-15 de ratón o rata, mientras que se observó una buena unión con los controles positivos.

40 Ejemplo 5. Selectividad de algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

Dado que IL-2 es la citocina más cercana a IL-15 por homología de secuencia, e IL-2 e IL-15 comparten dos cadenas de receptor comunes (la cadena IL-2/IL-15R β y la cadena γc común), la unión de los anticuerpos anti-IL-15 de la presente invención a IL-2 se ensayó por ELISA.

45 Las placas Maxisorp se recubrieron con IL-2 humana recombinante (R&D Systems cat. n.º 202-IL-010) de SEQ ID NO: 38 a 100 ng/pocillo en tampón de recubrimiento de carbonato durante 2 horas a 37 °C. A continuación, la placa se bloqueó con suero de cabra normal al 2 % durante 30 min a 37 °C y se lavó 4 veces con PBS-Tween (Tween-20 al 0,05 % en PBS, v/v). Los anticuerpos de prueba o el anticuerpo biotinilado de control positivo (anti-IL-2 Novus Bio cat. n.º NBP1-43491) se añadieron a la placa por duplicado a 5 $\mu g/ml$ en PBS-Tween y la placa se incubó con un suave balanceo a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween y se añadió a la placa una dilución apropiada de anticuerpo anti-IgG humana de cabra (Millipore cat. n.º AP309P) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para los anticuerpos de prueba, o estreptavidina-HRP para el anticuerpo de control positivo, y se dejó balanceándose a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween y se incubó con sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 1 M y se leyó a 450 nm.

La figura 3 muestra que ninguno de los anticuerpos anti-IL-15 ensayados según la invención se une a la IL-2 humana a la concentración de 5 µg/ml ensayada, mientras que un anticuerpo de control positivo mostró una fuerte unión.

Ejemplo 6. Inhibición de la proliferación/supervivencia inducida por IL-15 soluble en líneas celulares por algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

Los anticuerpos según la presente invención se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la proliferación/supervivencia de células Kit 225 o M-07e inducida por IL-15 (*Finch et al., 2011*, anteriormente).

La línea celular Kit 225 se estableció a partir de un paciente con leucemia linfocítica crónica de linfocitos T (Hori et al., 1987, *Blood*, 70:1069-1072). Las células Kit 225 expresan las 3 cadenas del receptor de IL-15 (IL-15R α , IL-15R β e IL-15R γ) (Mortier et al., 2006, *J. Biol. Chem.*, 281:1612-1619). La línea celular M-07e se estableció a partir de la sangre periférica de una niña de 6 meses con leucemia megacarioblástica aguda (Brizzi et al., 1990, *Br J Haematol.*, 76:203-239). Las células M-07e expresan solo las cadenas IL-15R β e IL-15R γ del receptor de IL-15 (Meazza et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 78:189-95).

Se cultivaron células Kit 225 (Hori et al., 1987, *Blood*, 70(4):1069-1072) y células M-07e (Leibniz-Institute DSMZ) y se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con Hepes 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, PAA) y 200 U/ml de IL-2 humana (R&D Systems cat. n.º 202-IL) de SEQ ID NO: 38. Un día antes de los experimentos, las células se privaron de nutrientes en el mismo medio de cultivo sin IL-2 durante 24 horas. Después de eso, se añadieron 5 x 10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos por triplicado, en presencia de diversas diluciones de anticuerpos de prueba, así como IL-15 humana recombinante (R&D systems cat. n.º 247-IL) o IL-15 de mono recombinante (My Biosource cat. n.º MBS948894) a una concentración final de 1 ng/ml y un volumen total de 100 µl de medio de cultivo por pocillo. Como se ha mencionado anteriormente, debido a que las secuencias publicadas de IL-15 de macaco rhesus y macaco cynomolgus son idénticas, dicha proteína IL-15 recombinante se denominó IL-15 de mono macaco.

Los cultivos celulares se mantuvieron durante 48 h a 37 °C, en CO₂ al 5 % y a continuación se dispensaron 100 µl de una solución Titerglo (que mide el consumo de ATP, Promega) a cada pocillo, y el contenido se mezcló por pipeteo vigoroso. Las placas se incubaron durante 15-20 min a temperatura ambiente antes de la lectura. La señal de luminiscencia se leyó en un lector de placas como una medida de la supervivencia celular. Usando el software Graphpad Prism, se representaron los valores corregidos contra las concentraciones de anticuerpo y se determinaron las concentraciones inhibitorias medias máximas (CI₅₀) usando el inhibidor logarítmico frente a la respuesta (tres parámetros). Los valores de CI₅₀ expresados como molaridad se extrapolaron de la concentración en ng/ml usando un valor de peso molecular de 150 kDa para todos los anticuerpos.

Tabla 4

Anticuerpo	CI ₅₀ en células M-07e (nM)		CI ₅₀ en células Kit 225 (nM)	
	IL-15 humana	IL-15 de mono macaco	IL-15 humana	IL-15 de mono macaco
huB-E29-2	0,017	0,23	0,083	0,112
huB-E29-10	4,2	41,3	17,0	17,5
huB-E29-24	19,1	10,4	29,3	26,7
146B7 anticuerpo comparativo 2	3,2	NT	3,7	NT
NT: no ensayado				

Como se muestra en la Tabla 4, las tres variantes de anticuerpo B-E29 humanizadas ensayadas, así como 146B7 fueron capaces de inhibir la proliferación/supervivencia inducida por IL-15 de células M-07e y Kit 225. El huB-E29-2 humanizado fue superior en potencia a todos los demás anticuerpos ensayados en células M-07e, así como en células Kit 225.

Ejemplo 7. Inhibición de la proliferación/supervivencia inducida por IL-15 *trans* en la línea celular por algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

Algunos anticuerpos según la presente invención se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la proliferación/supervivencia de células M-07e inducidas por IL-15 humana (que expresan solo IL-15R β), presentándose IL-15 después de unirse a una construcción IL-15R α -Fc inmovilizada sobre plástico. Esta configuración experimental imita la presentación *trans* de IL-15 descrita en la bibliografía y aparentemente importante para la biología de IL-15 (*Stonier, et al., 2010*, anteriormente).

Los pocillos de placas de 96 pocillos se recubrieron con 1 µg de quimera IL-15Rα-Fc humana recombinante (R&D Systems cat. n.º 7194-IR-050) en 100 µl de PBS durante 2 horas a 37 °C. El contenido de los pocillos se aspiró, a continuación, se añadieron 150 µl de medio RPMI 1640 complementado con Hepes 10 mM, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, L-Glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, suero fetal bovino inactivado con calor al 10 % (FBS, PAA), denominado medio de cultivo, por pocillo, y las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C. El contenido de los pocillos se aspiró, a continuación, se añadieron 100 µl de una solución de 300 ng/ml de IL-15 humana (R&D Systems), y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. El contenido de los pocillos se aspiró, a continuación, se usaron 200 µl de medio de cultivo dos veces para lavar la IL-15 no unida. Se añadieron diversas concentraciones de anticuerpos de prueba a cada pocillo por triplicado, a continuación, se añadieron 5 x 10⁴ células M-07e (se dejaron durante una noche en medio sin citocina). Los pocillos de control se diseñaron adecuadamente para asegurarse de que IL-15 no indujera la proliferación/supervivencia en este sistema en ausencia de IL-15Rα-Fc, y que IL-15Rα-Fc no indujera la proliferación/supervivencia en ausencia de IL-15.

Los cultivos celulares se mantuvieron durante 48 h a 37 °C, en CO₂ al 5 % y a continuación se dispensaron 100 µl de una solución Titerglo (que mide el consumo de ATP, Promega) a cada pocillo, y el contenido se mezcló por pipeteo vigoroso. Las placas se incubaron durante 15-20 min a temperatura ambiente antes de la lectura. La señal de luminiscencia se leyó en un lector de placas como una medida de la supervivencia celular. Usando el software Graphpad Prism, se representaron los valores corregidos contra las concentraciones de anticuerpo y se determinaron las concentraciones inhibitorias medias máximas (CI₅₀) usando el inhibidor logarítmico frente a la respuesta (tres parámetros). Los valores de CI₅₀ expresados como molaridad se extrapolaron de la concentración en ng/ml usando un valor de peso molecular de 150 kDa para todos los anticuerpos.

Tabla 5

Anticuerpo	CI ₅₀ en células M07e para presentación <i>trans</i> de IL-15 (nM)
huB-E29-2	0,37
huB-E29-10	0,53
huB-E29-24	0,65
146B7 anticuerpo comparativo 2	0,63

Como se muestra en la Tabla 5, todas las variantes de anticuerpo B-E29 humanizados ensayadas inhibieron la presentación *trans* de IL-15 humana a células M-07e con potencia similar.

Ejemplo 8: Ausencia de interferencia con la unión de IL-15 humana a IL-15Rα de algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

Los anticuerpos según la presente invención se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la unión de IL-15 humana biotinilada a una construcción recombinante de IL-15-Rα-Fc unida a placas (R&D Systems) según el procedimiento descrito por Finch et al. (*Finch et al., 2011*, anteriormente).

La interleucina-15Rα-Fc en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 600 pM se recubrió sobre placas MaxiSorp de 96 pocillos mediante incubación a 4 °C durante 16 h. Los pocillos se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 3 % (p/v) durante 2 h y se lavaron de nuevo con PBS. Los anticuerpos y los controles (incluyendo un anticuerpo que se sabe que bloquea la unión de IL-15 a IL-15Rα, R&D Systems cat. n.º NF150) se diluyeron en PBS con BSA al 0,1 % (p/v) y se añadieron a los pocillos de ensayo recubiertos con IL-15Rα-Fc. Se añadió IL-15 humana biotinilada (R&D Systems cat. n.º NF150) a una concentración final de 100 pM y las placas de ensayo se incubaron durante 1 h. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % (v/v) seguido de la adición de una dilución óptima de estreptavidina-peroxidasa. Después de 30 minutos de incubación, las placas se lavaron siete veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % (v/v) y se añadió sustrato de peroxidasa. Una vez que la reacción se completó y se detuvo con H₂SO₄, se midió la absorbancia a una longitud de onda de emisión de 450 nm.

La figura 4 muestra que un anticuerpo de control positivo fue capaz de inhibir de manera dependiente de la dosis la unión de IL-15 humana biotinilada a IL-15-Rα-Fc mientras que los anticuerpos anti-IL-15 huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 no pudieron, hasta la dosis más alta ensayada de 150 µg/ml. Por el contrario, basándose en las observaciones de *Bernard et al., 2004* anteriormente, el anticuerpo anti-IL-15 monoclonal de ratón B-E29 (anticuerpo comparativo 1) previene la unión de IL-15 a IL-15Rα.

Ejemplo 9: Neutralización *in vivo* de IL-15 humana de algunos anticuerpos anti-IL-15 según la invención

Las células de ratón responden a la IL-15 humana, lo que permite probar la inhibición funcional *in vivo* de IL-15 de anticuerpos anti-IL-15 según la invención a pesar de que esos anticuerpos no reconocen la IL-15 de ratón como se

muestra en el Ejemplo 4. La interleucina-15 inyectada en ratones puede inducir la proliferación y la acumulación de diversos subconjuntos de linfocitos tales como células asesinas naturales (NK) en el bazo. Sin embargo, la IL-15 por sí sola es poco activa, puede deberse a su semivida muy corta, y los complejos estabilizados de IL-15 unida a IL-15R α son más eficientes *in vivo*.

Se analizó la capacidad de los anticuerpos ejemplares de la presente invención para inhibir la acumulación de células NK inducida por el complejo IL-15/IL-15R α -Fc en el bazo de ratones macho C57BL/6 (*Finch et al., 2011*, anteriormente). A grupos de 5 ratones durante tres días consecutivos se les inyectó una mezcla de 1 μ g de IL-15 humana (Prospec) y 3,6 μ g de IL-15R α -Fc humana (R&D Systems), y el primer y segundo día del experimento 100 μ g y 62 μ g, respectivamente, de anticuerpos de prueba y controles. Un día después de la última inyección, se extrajeron los bazos, se contaron los esplenocitos y se analizaron las células NK por citometría de flujo y se definieron como células CD45⁺NK1.1⁺CD3⁻.

Como se muestra en la figura 5, la inyección del complejo IL-15/IL-15R α -Fc indujo una fuerte acumulación de células NK en el bazo de ratón que podría inhibirse por completo mediante el tratamiento con los anticuerpos huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 ejemplares de la invención, pero no un anticuerpo de isotipo IgG1 humano de control.

Ejemplo 10: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-IL-15 según la invención

El mapeo de epítomos de anticuerpos anti-IL-15 de la invención se realizó analizando la unión de dichos anticuerpos a bibliotecas de péptidos estructurados diseñados para representar epítomos lineales, pero también discontinuos de IL-15 usando la tecnología de péptidos ligados químicamente en andamiajes (CLIPS) (Pepscan Presto Bv, Lelystad, Países Bajos). La tecnología CLIPS (Timmermann et al., 2007, *J. Mol. Recognit.*, 20, 283-99) permite estructurar péptidos en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, pliegues en forma de lámina, pliegues en forma de hélice, y combinaciones de los mismos. Los péptidos estructurales se inmovilizan en matrices. La unión de los anticuerpos a cada uno de los péptidos sintetizados se ensayó en un ELISA de matriz basado en PEPSCAN. La señal para cada péptido se mide usando una cámara de dispositivo acoplado a carga, se cuantifica, y los resultados de toda la matriz se procesan para definir qué péptidos se reconocen mejor. Las sustituciones de aminoácidos dentro de los péptidos pueden permitir determinar residuos de unión más críticos.

Se encontró usando esta técnica que los anticuerpos de la invención huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 se unen preferentemente a péptidos lineales y restringidos que contienen el tramo peptídico de la secuencia⁶¹DTVENLILANN⁷² (SEQ ID NO: 43). Esta observación es similar a la informada para el anticuerpo comparativo 1, B-E29 (*Bernard et al., 2004*, anteriormente). Usando la sustitución de un solo aminoácido, los residuos encontrados como los más esenciales para la unión de los anticuerpos de la invención, anticuerpos huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 contra IL-15, fueron D61, E64, I68 y N71.

El anticuerpo comparativo 1 se caracteriza por VL y VH como se muestra en la SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40, respectivamente. Según *Bernard et al., 2004*, anteriormente, B-E29 afecta a la unión de IL-15 a IL-15R α a través de la unión a los residuos L66 y 167, que no se consideran críticos para la unión de los anticuerpos de la invención huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24. Por otro lado, todavía según *Bernard et al.*, los residuos E64, N65 y 168 son importantes para la prevención de la unión de IL-15 a IL-15R β por B-E29, y dos de estos tres residuos, E64 y 168, se consideraron críticos para la unión de los anticuerpos huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 a IL-15. La prevención de la unión de IL-15 a la cadena IL-15R β es importante para bloquear la señalización de IL-15. Por lo tanto, aunque los anticuerpos huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 comparten un epítomo superpuesto con el anticuerpo B-E29 original, las diferencias estructurales pueden explicar un modo de acción diferente, que es la pérdida de capacidad para prevenir la unión de IL-15 a IL-15R α , como se muestra en la presente solicitud (Ejemplo 8), mientras se conserva la capacidad de bloquear la señalización mediada por IL-15.

También se observó que los anticuerpos de la invención huB-E29-10 y huB-E29-24 mostraron menos tolerancia para las sustituciones dentro del tramo peptídico de SEQ ID NO: 43 que el anticuerpo huB-E29-2, lo que significa que la pérdida de señal fue más frecuente, lo que podría estar relacionado con su menor afinidad por IL-15 como se muestra en la presente solicitud (Ejemplo 3).

Finalmente, el anticuerpo comparativo 2, 146B7, no mostró ninguna unión fiable sobre el fondo en ninguna de las matrices peptídicas ensayadas y, por lo tanto, probablemente reconoce un complejo/epítomo discontinuo en IL-15 (Villadsen et al., 2003, *J. Clin. Invest.*, 112: 1571-1580). La mutagénesis de aminoácidos informó que los residuos D8 y Q108 de IL-15 eran esenciales para la unión de 146B7, sin una descripción adicional del epítomo reconocido por este anticuerpo. Los datos presentados en el ejemplo actual son según este hallazgo, lo que sugiere un epítomo no lineal para 146B7, claramente distinto de los reconocidos por los anticuerpos de la invención huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24.

El epítomo reconocido por el anticuerpo anti-IL-15 DISC0280 (anticuerpo comparativo 3) se determinó usando cristalografía (Lowe et al., 2010, *J. Mol. Biol.*, 406, pág. 160-175). El anticuerpo DISC0280 se caracteriza por VL CDR3 y VH CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, respectivamente. Como se esperaba a partir del hecho de que los anticuerpos comparativos B-E29 y DISC0280 compitieron por la unión de IL-15 (*Finch et al., 2010*, *J*

Mol Biol., 406(1), pág. 160-175), se encontraron residuos similares entre el epítipo DISC0280 y los epítipos reconocidos por los anticuerpos huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 de la presente invención, concretamente, E64 y N71. Sin embargo, se describieron otros enlaces de hidrógeno para DISC0280 con residuos de IL-15: K41, E46, Q48, L52, E53, y E89. Por lo tanto, DISC0280 y los anticuerpos de la invención huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 tienen un epítipo superpuesto pero distinto. Además, dos residuos encontrados más importantes para la unión de huB-E29-2, huB-E29-10 y huB-E29-24 a IL-15 no forman parte del epítipo DISC0280: D61 y 168.

Ejemplo 11: Efecto de los anticuerpos anti-IL-15 según la invención en líneas celulares de pacientes con enfermedad celíaca refractaria

Los efectos del anticuerpo de la invención huB-E29-2 y el anticuerpo comparativo 146B7 sobre la prevención de la apoptosis y la activación de líneas celulares de linfocitos intraepiteliales (IEL) primarias de pacientes con enfermedad celíaca refractaria (RCD) de tipo II inducidas por IL-15 humana recombinante, se ensayaron *in vitro*. El porcentaje de células apoptóticas se analizó mediante la tinción de células con Anexina V y yoduro de propidio (PI) y se midió por citometría de flujo. La expresión de la proteína STAT5 fosforilada (pSTAT5), también mediante una técnica de citometría de flujo, se utilizó para medir la activación de las líneas celulares IEL primarias por IL-15 y su inhibición por anticuerpos anti-IL-15.

El anticuerpo anti-IL-15 humanizado de la invención huB-E29-2 inhibió de forma potente la prevención de la apoptosis inducida por IL-15 en líneas celulares IEL primarias de RCD de tipo II de tres pacientes diferentes *in vitro* (figura 6), con una concentración inhibitoria media máxima (CI₅₀) de 2,36 nM calculada para una de las tres líneas celulares ensayadas (HAM_RAC). Este anticuerpo también inhibió la fosforilación de STAT5 inducida por IL-15 en todas las líneas celulares IEL primarias de pacientes con RCD de tipo II ensayadas, cuando se usó a la concentración calculada para dar una inhibición de la apoptosis del 80 % en la línea celular HAM_RAC. Finalmente, a esta misma concentración, huB-E29-2 fue mucho más eficiente que el anticuerpo anti-IL-15 completamente humano 146B7 para la inhibición de la prevención inducida por IL-15 de la apoptosis y la fosforilación de STAT5 en líneas celulares IEL primarias de pacientes con DCR de tipo II (figura 6).

Ejemplo 12: Efectos de anticuerpos anti-IL-15 según la invención en ratones transgénicos para IL-15 humana, un modelo para enfermedad celíaca refractaria.

Los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-15 humana bajo el control de T3b, un promotor específico de enterocitos (ratones IL-15TgE; Ohta et al., 2002, J. Immunol. 169(1), 460-468) muestran una acumulación anómala y masiva de linfocitos intraepiteliales (IEL). Este modelo se ha postulado para recapitular algunas de las características de la enfermedad celíaca refractaria humana (*Malamut et al., 2010*, anteriormente). Un anticuerpo contra IL-15, AMG 714, con una secuencia idéntica al anticuerpo 146B7 descrito en el presente documento e identificado anteriormente como HuMaxIL-15 (Villadsen et al., 2003, J Clin Invest, 112(10): 1571-80; Lebrech et al. 2013, J Immunol., 191(11):5551-8), es capaz de revertir la acumulación de IEL cuando se administra a estos ratones, promoviendo la apoptosis de IEL (*Malamut et al., 2010*, anteriormente).

El anticuerpo anti-IL-15 de la invención huB-E29-2, o un anticuerpo de isotipo de control IgG1, se administró por vía intraperitoneal dos veces a la semana a una dosis de 100 µg a grupos de ratones transgénicos T3b-hIL-15. Después del tratamiento de dos semanas, los IEL CD3⁺CD8⁺ se numeraron y se analizaron usando técnicas de citometría de flujo estándar (*Malamut et al., 2010*, anteriormente). Se observó que el tratamiento con huB-E29-2 dio como resultado una disminución estadísticamente significativa de IEL CD3⁺CD8⁺ en comparación con el anticuerpo de control (figura 7).

Ejemplo 13: Efectos de los anticuerpos anti-IL-15 en un modelo inducido por alérgenos de esofagitis eosinófila.

Los ratones genéticamente deficientes para la cadena IL-15Rα del receptor de IL-15 fueron resistentes a la inducción de esofagitis eosinófila después de la instilación nasal de *Aspergillus fumigatus* (*Zhu et al., 2010*, anteriormente). Los anticuerpos que se unen a y neutralizan la IL-15 de ratón, tal como el clon AIO.3 (eBiosciences) se administran a ratones expuestos a *Aspergillus fumigatus* para probar la actividad de los anticuerpos anti-IL-15 para el tratamiento de la esofagitis eosinófila. Los grupos de ratones se administran por vía intranasal con una preparación de *Aspergillus fumigatus* los días de estudio 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18. Los animales se tratan en diferentes puntos temporales con dosis apropiadas de un anticuerpo anti-IL-15 de ratón neutralizante o un anticuerpo de isotipo de control. Como control positivo, los ratones se tratan con dexametasona. El Día de estudio 19, el esófago de cada ratón se procesa y se tiñe, y el infiltrado eosinófilo se mide a través de un microscopio. Además, el lavado broncoalveolar se realiza para medir la infiltración de células inflamatorias en las vías respiratorias.

Ejemplo 14: Efecto de los anticuerpos anti-IL-15 según la invención sobre el número de células NK circulantes en primates no humanos.

Se demostró que la administración de anticuerpos anti-IL-15 a monos cynomolgus induce una disminución del número de células NK circulantes dentro de un periodo de dos semanas (Lebrech et al., 2013, J Immunol, 191(11), 5551-5558).

Diferentes anticuerpos mostraron un efecto diferente: la dosis mínima de anticuerpo anti-IL-15 Hu714MuXHu capaz de inducir la reducción de células NK *in vivo* fue de 0,1 mg/kg, mientras que la dosis mínima de anticuerpo anti-IL-15 AMG 714, con una secuencia idéntica al anticuerpo 146B7 descrito en el presente documento (Villadsen et al., 2003, J Clin Invest, 112(10): 1571-80; Lebrech et al., 2013, J Immunol, 191(11):5551-8), capaz de inducir la reducción de células NK *in vivo* fue de 150 mg/kg.

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-15 de la invención para modular el número de células NK circulantes se ensaya *in vivo* en monos cynomolgus. Se administran varias dosis de dichos anticuerpos, que varían de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, a monos cynomolgus por vía intravenosa, y se evalúan el número de células NK circulantes usando una técnica de citometría de flujo aplicada a muestras de sangre antes de la dosis y los días de estudio 1, 3, 5, 8, 14 y 21. La modulación del número de células NK circulantes en primates no humanos podría definir un marcador de las actividades farmacológicas de los anticuerpos anti-IL-15 *in vivo* y, por lo tanto, podría usarse ventajosamente para definir la dosis óptima en pacientes.

LISTA DE SECUENCIAS

IL-15 madura humana

SEQ ID NO: 1

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS
IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

IL-15 madura de ratón

SEQ ID NO: 2

NWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMT
LNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS

IL-15 madura de rata

SEQ ID NO: 3

NWIDVRYDLEKIESLIQFIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMT
LNETVRNVLYLANSTLSSNKNVIESGCKECEEELEERNFTEFLQSFIVHIVQMFINTS

IL-15 madura de macaco Rhesus/mono Cynomolgus

SEQ ID NO: 4

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISHESGDTD
IHDTVENLIILANNILSSNGNITESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

huVH1

SEQ ID NO: 5

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH2

SEQ ID NO: 6

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH3

SEQ ID NO: 7

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH4

5

SEQ ID NO: 8

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSLITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH5

SEQ ID NO: 9

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSFITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

10

huVH6

SEQ ID NO: 10

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSIITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

15

huVH7

SEQ ID NO: 11

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSAITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

20

huVH8

SEQ ID NO: 12

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGYAMDYWGQGT
LVTVSS

25

huVH9

SEQ ID NO: 13

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGFAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH10

SEQ ID NO: 14

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGAAMDYWGQGT
LVTVSS

huVH11

5

SEQ ID NO: 15

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGWALDYWGQGT
LVTVSS

huVH12

SEQ ID NO: 16

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAFDYWGQGT
LVTVSS

10

huVH13

SEQ ID NO: 17

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAIDYWGQGT
LVTVSS

15

huVH14

SEQ ID NO: 18

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

20

huVH15

SEQ ID NO: 19

EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
LVTVSS

25

huVH16

SEQ ID NO: 20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRVSFITGGYAFDYWGQGT
LVTVSS

huVH18

SEQ ID NO: 21
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGYAMDYWGQGT
LTVVSS

5 **huVH20**

SEQ ID NO: 22
EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSFITGGYAMDYWGQGT
LTVVSS

huVH21

10

SEQ ID NO: 23
EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYT
YYPESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSFITGGYAMDYWGQGT
LTVVSS

huVL1

SEQ ID NO: 24
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWYQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQDSFVPTYTFGQGTKLEIK

15

huVL2

SEQ ID NO: 25
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWFQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQDSFVPTYTFGQGTKLEIK

20

huVL3

SEQ ID NO: 26
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWYQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQDSFVPTYTFGQGTKLEIK

25

huVL4

SEQ ID NO: 27
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWYQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQESFVPTYTFGQGTKLEIK

30

huVL5

SEQ ID NO: 28

DVVMTQSP~~LSLP~~VTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWYQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI~~SR~~VEAEDVGVYYCFQDTFV~~PY~~TFGQGTKLEIK

huVL6

SEQ ID NO: 29

DVVMTQSP~~LSLP~~VTLGQPASISCRSSQSIVDITGNTYLEWFQQRPGQSPRLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI~~SR~~VEAEDVGVYYCFQESFV~~PY~~TFGQGTKLEIK

5

Región constante de cadena pesada IgG1m3

SEQ ID NO: 30

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVT~~PSS~~SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI~~SRT~~PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI~~SK~~AKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~~PP~~VLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNV~~FSC~~SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

Región constante IgK_m3 de cadena ligera

SEQ ID NO: 31

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCL~~LN~~NFY~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSK~~D~~STY~~SL~~SSTL~~T~~LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS~~P~~VTKSFNRGEC

15

cVH1 (región variable de cadena pesada de ratón B-E29)

SEQ ID NO: 32

EVRLMASGGGLVKPGGSLKLS~~CAASEFTFSNYAM~~SWVRQTPEKRLEWVATIS~~RGGDYT~~
YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ~~MSSLR~~SEDTALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
SVTVSS

20

cVH2

SEQ ID NO: 33

EVRLLASGGGLVKPGGSLKLS~~CAASEFTFSNYAM~~SWVRQTPEKRLEWVATIS~~RGGDYT~~
YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ~~MSSLR~~SEDTALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
SVTVSS

cVH3

SEQ ID NO: 34

EVQLLASGGGLVKPGGSLKLS~~CAASEFTFSNYAM~~SWVRQTPEKRLEWVATIS~~RGGDYT~~
YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ~~MSSLR~~SEDTALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
SVTVSS

25

cVH4

SEQ ID NO: 35

EVRLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASEFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISRGGDYT
YYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRS EDTALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQGT
SVTVSS

cVK1

SEQ ID NO: 36
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDITGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCFQDSFVPYTFGGGTKLEIK

5

hVK2

SEQ ID NO: 37
EVVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSIVDITGNTYLEWYQOKPGQAPRLLIYKVFN
RFSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCFQDSFVPYTFGQGTKLEIK

10

IL-2 humana

SEQ ID NO: 38
MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTR
MLTFKFPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

15

VL-146B7

SEQ ID NO: 39
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASRRATG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQRYGSSHTFGQGTKLEIS

20

VH-146B7

SEQ ID NO: 40
EVQLVQSGAEVVKKPGESLKISCKVSGYFFTTYWIGWVRQMPGKGLEYMGI IYPGDSDT
RYSPSFQGVVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARGGNWNCFDYWGQGTLVTV
SS

VL CDR3 DISC0280

Posiciones Kabat: 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95A, 95B, 96, 97 SEQ ID NO: 41
AWYDRELSEWV

25

VH CDR3 DISC0280

Posiciones Kabat: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 100b, 100c, 100d, 100e, 100f, 100g, 101, 102
SEQ ID NO: 42 DPAAWPLQQSLAWFDP

30

Tramo de fragmento peptídico de IL-15

SEQ ID NO: 43
DTVENLILANN

35

ES 2 800 158 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CALYPSO BIOTECH SA

<120> ANTICUERPOS CONTRA IL-15

5 <130> P1792PC00

<150> EP 14175361.6

<151> 2014-07-02

10 <160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

20

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

<210> 2

25 <211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

30

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
1 5 10 15

ES 2 800 158 T3

Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 50 55 60

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 65 70 75 80

Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe
 85 90 95

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110

Thr Ser

<210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> rata

5

<400> 3

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
 1 5 10 15

Gln Phe Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
 20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
 50 55 60

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
 65 70 75 80

Ile Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Arg Asn Phe
 85 90 95

Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110

10

Thr Ser

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Macaco Rhesus / mono Cynomolgus

15

<400> 4

20

ES 2 800 158 T3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser His Glu Ser Gly Asp Thr Asp Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ile Leu Ser Ser Asn Gly Asn Ile
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

<210> 5
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huVH1

10 <400> 5

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

15 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

ES 2 800 158 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> huVH2

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

10 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7
 15 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> huVH3

<400> 7

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH4

<400> 8

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Leu Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 9
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> huVH5
 <400> 9
 10
 Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Val Ser Phe Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15
 <210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> huVH6
 <400> 10

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Ile Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH7

<400> 11

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Ala Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 12
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> huVH8

<400> 12

10

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

15

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> huVH9

<400> 13

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH10

<400> 14

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Ala Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> huVH11

<400> 15

10

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

15

<210> 16
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> huVH12

<400> 16

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH13

<400> 17

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Ile Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> huVH14

<400> 18

10

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

15

<210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> huVH15

<400> 19

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH16

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Phe Ile Thr Gly Gly Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 21
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> huVH18

<400> 21

10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

15

<210> 22
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> huVH20

<400> 22

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Phe Ile Thr Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> huVH21

<400> 23

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Phe Ile Thr Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> huVL1
 <400> 24
 10
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
 20 25 30
 Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
 85 90 95
 Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 15
 <210> 25
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> huVL2
 20
 <400> 25

ES 2 800 158 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huVL3

10 <400> 26

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

15 Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> huVL4

ES 2 800 158 T3

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Glu
85 90 95

Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

5

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> huVL5

<400> 28

15

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

Thr Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

20

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 800 158 T3

<220>

<223> huVL6

5 <400> 29

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Glu
85 90 95

Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30

10 <211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

15

ES 2 800 158 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

ES 2 800 158 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 31
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

10 <210> 32
<211> 122
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<400> 32

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 122
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cVH2

<400> 33

Glu Val Arg Leu Leu Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

ES 2 800 158 T3

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cVH3

<400> 34

10

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cVH4

20

<400> 35

ES 2 800 158 T3

Glu Val Arg Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Gly Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Val Ser Met Ile Thr Gly Gly Trp Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cVK1

10 <400> 36

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

15 Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37
<211> 112
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

ES 2 800 158 T3

<220>
<223> hVK2

5 <400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ile
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

Ser Phe Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 38
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 38

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

ES 2 800 158 T3

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 39
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> VL-146B7

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

ES 2 800 158 T3

	65				70						75				80	
	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ser	His
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Ser					
				100					105							
	<210>	40														
	<211>	118														
5	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	VH-146B7														
10	<400>	40														
	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										
				115												
15	<210>	41														
	<211>	11														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
20	<223>	VL CDR3 DISC0280														
	<400>	41														
	Ala	Trp	Tyr	Asp	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Trp	Val					
25	1				5					10						
	<210>	42														
	<211>	16														
	<212>	PRT														
30	<213>	Secuencia artificial														

ES 2 800 158 T3

<220>

<223> VH CDR3 DISC0280

<400> 42

5

Asp Pro Ala Ala Trp Pro Leu Gln Gln Ser Leu Ala Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 43

<211> 12

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tramo de fragmento peptídico de IL-15

15

<400> 43

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a IL-15 que comprende:
 - (1) una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o una variante de SEQ ID NO: 5, en la que dicha variante de SEQ ID NO: 5 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, excepto que 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de dicha secuencia están sustituidos por un aminoácido diferente seleccionado de los siguientes:
 - (i) VH RH3 está sustituido por glutamina (Q), y/o VH MH5 está sustituido por valina (V), y/o VH AH6 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o VH AH49 está sustituido por serina (S) y/o
 - (ii) VH DH61 está sustituido por un ácido glutámico (E), y/o VH SH62 está sustituido por treonina (T), y/o
 - (iii) VH MH98 está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), isoleucina (I) o alanina (A), y/o VH WH100C está sustituido por tirosina (Y), fenilalanina (F), o alanina (A), y/o VH MH100E está sustituido por leucina (L), fenilalanina (F), o isoleucina (I), y
 - (2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en el que las posiciones de los aminoácidos sustituidos se expresan según el sistema de numeración de Kabat.
2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que comprende:
 - (1) una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, excepto que:
 - (i) VH RH3 está sustituido por glutamina (Q), y/o VH MH5 está sustituido por valina (V), y/o VH AH6 está sustituido por ácido glutámico (E), y/o
 - (ii) VH SH62 está sustituido por treonina (T), y/o
 - (iii) VH WH100C está sustituido por tirosina (Y), y
 - (2) una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.
3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende:
 - (1) una región variable de cadena pesada seleccionada de: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 5, y
 - (2) una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.
5. El anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo humanizado.
6. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que inhibe la actividad de IL-15 tal como la proliferación y/o la supervivencia inducida por IL-15 de líneas celulares Kit 225 o M-07e.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
9. Un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleica que codifica dicho anticuerpo o fragmento del mismo en condiciones suficientes para promover la expresión de dicho anticuerpo o fragmento del mismo.
10. Una composición farmacéutica que comprende uno o más de: (i) un anticuerpo que se une a IL-15 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, (ii) un ácido nucleico según la reivindicación 7, (iii) un vector de expresión recombinante que comprende dicho ácido nucleico en (ii), y/o (iv) una célula huésped según la reivindicación 8, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 que comprende además un coagente útil en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo

a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, o un compuesto que reduce la inflamación intestinal, y/o protege la mucosa intestinal, y/o reduce la inmunorreactividad de los péptidos de gluten, y/o modifica la microbiota intestinal.

- 5 12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como un medicamento.
- 10 13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con IL-15.
- 15 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 se selecciona de una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, una neoplasia, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos.
- 20 15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según las reivindicaciones 13 o 14, en el que la enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 se selecciona de artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celíaca tal como enfermedad celíaca refractaria, sarcoidosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades hepáticas inducidas por hepatitis C, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, atresia biliar, alopecia areata, rechazo a trasplante, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, y esofagitis eosinófila.
- 25 16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad o trastorno relacionado con IL-15 se selecciona de una enfermedad celíaca tal como enfermedad celíaca refractaria, esofagitis eosinófila, hepatitis autoinmune, enfermedad de Alzheimer, infecciones virales e infecciones por hantavirus.
- 30 17. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administrará en combinación con un coagente útil en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio, una neoplasia, rechazo a trasplante, una afección metabólica y/o una enfermedad infecciosa causada por patógenos parasitarios, virales o bacterianos, o un compuesto que reduce la inflamación intestinal, y/o protege la mucosa intestinal, y/o reduce la inmunorreactividad de péptidos de gluten, y/o modifica la microbiota intestinal.
- 35 18. Un procedimiento *ex vivo* para detectar la presencia y/o concentración de la proteína IL-15 en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 40 (i) Proporcionar una muestra biológica de un sujeto,
(ii) Hacer reaccionar dicha muestra biológica con al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en condiciones suficientes para unir la proteína IL-15 presente en dicha muestra biológica a dicho al menos un anticuerpo o fragmento del mismo a través de interacciones antígeno-anticuerpo; y
(iii) Detectar una señal proporcional al nivel de complejo de antígeno-anticuerpo formado en la etapa (ii),
- 45 en el que la intensidad de la señal se correlaciona con la concentración de proteína IL-15 en la muestra biológica.

(A)	cVH2	<u>EVRLIASGGGLVKPGGSLKLSCAAASEFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISRGGDYTY</u>	60
	cVH3	<u>EVQLIASGGGLVKPGGSLKLSCAAASEFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISRGGDYTY</u>	60
	cVH1	<u>EVRLMASGGGLVKPGGSLKLSCAAASEFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISRGGDYTY</u>	60
	cVH4	<u>EVRLMESGGGLVKPGGSLKLSCAAASEFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISRGGDYTY</u>	60
	hVH1	<u>EVRLMASGGGLVQPGGSLRLSCAAASEFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISRGGDYTY</u>	60
		* * * * *	
	cVH2	<u>PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSED</u> TALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQTSVTV	120
	cVH3	<u>PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSED</u> TALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQTSVTV	120
	cVH1	<u>PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSED</u> TALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQTSVTV	120
	cVH4	<u>PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSED</u> TALYYCARRVSMITGGWAMDYWGQTSVTV	120
	hVH1	<u>PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVSMITGGWAMDYWGQTLVTV</u>	120
		* * * * *	
	cVH2	SS 122	
	cVH3	SS 122	
	cVH1	SS 122	
	cVH4	SS 122	
	hVH1	SS 122	
(B)	CVK1	<u>DVLMTQTPLSLPSVSLGDQASISCRSSQSI</u> VDITGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVENRF	60
	hVK1	<u>DVVMTQSPLSLPEVTLGQPASISCRSSQSI</u> VDITGNTYLEWYQQRPGQSPRLIYKVENRE	60
	hVK2	<u>EVVMTQSPATLSLSPGERATLS</u> CRSSQSIVDITGNTYLEWYQKPGQAPRLIYKVENRE	60
		* * * * *	
	CVK1	<u>SGVPDRFSGSGGTDF</u> TLKISRVEAEDLGLYCFQDSEVPYTFGGGTKLEIK	112
	hVK1	<u>SGVPDRFSGSGGTDF</u> TLKISRVEAEDVGVYCFQDSEVPYTFGGGTKLEIK	112
	hVK2	<u>SGIPARFSGSGGTDF</u> TLTISISLEPEDEAVYCFQDSEVPYTFGGGTKLEIK	112
		* * * * *	

Figura 1

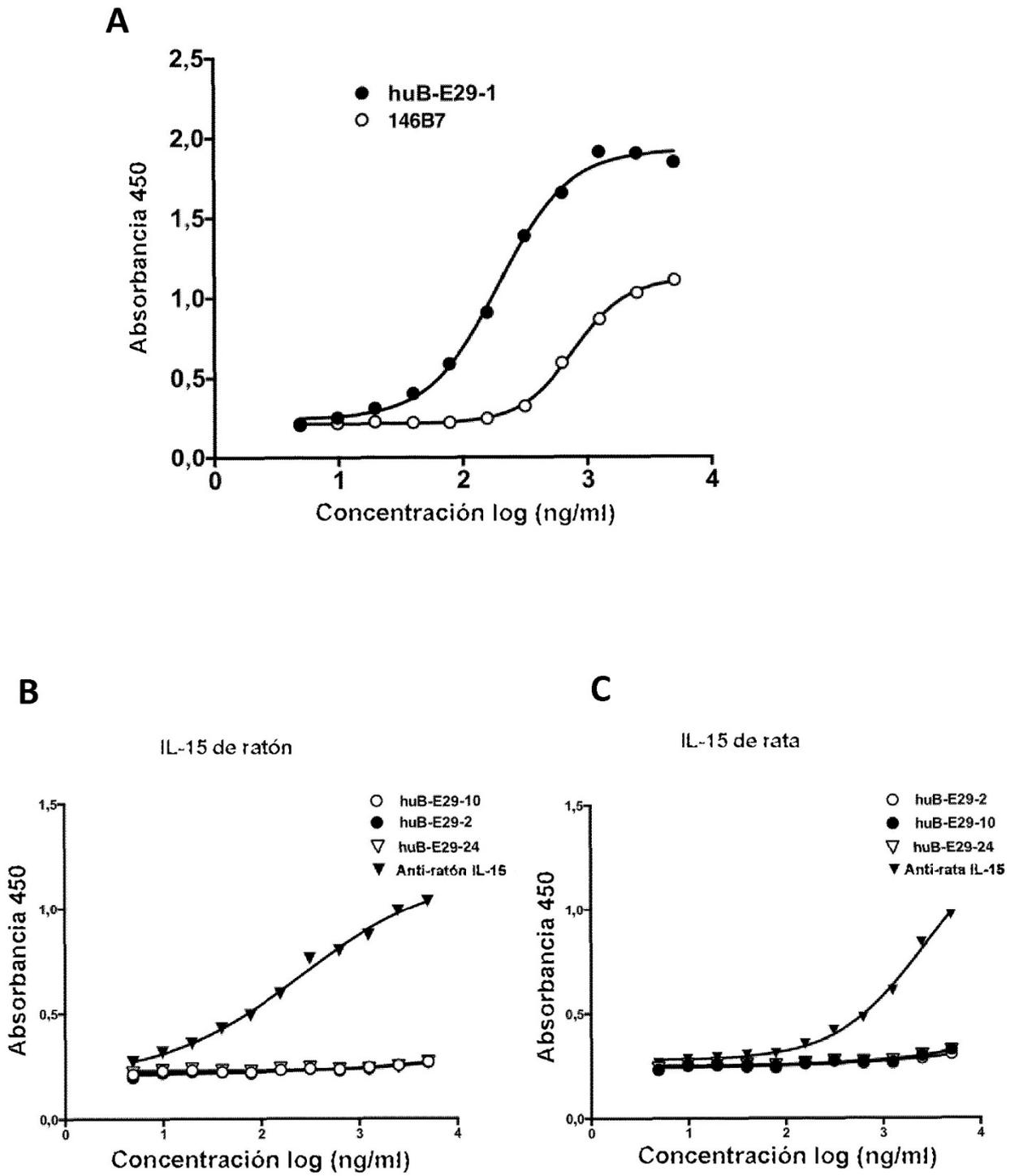


Figura 2

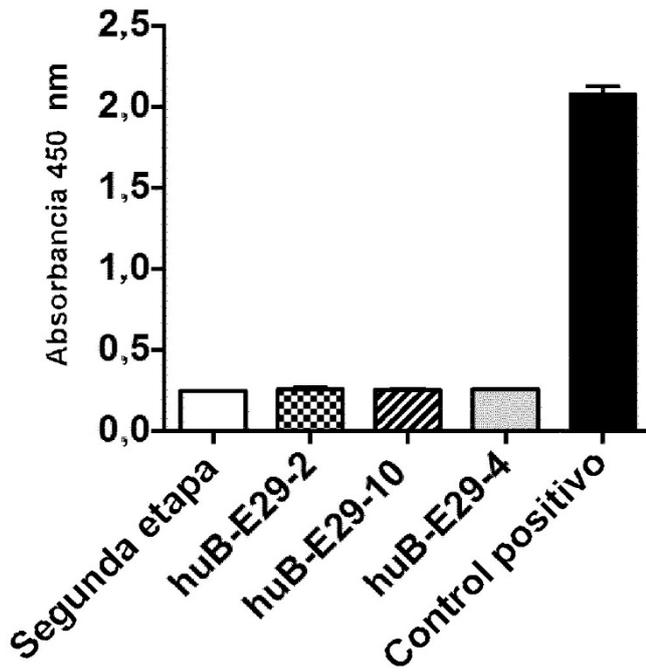


Figura 3

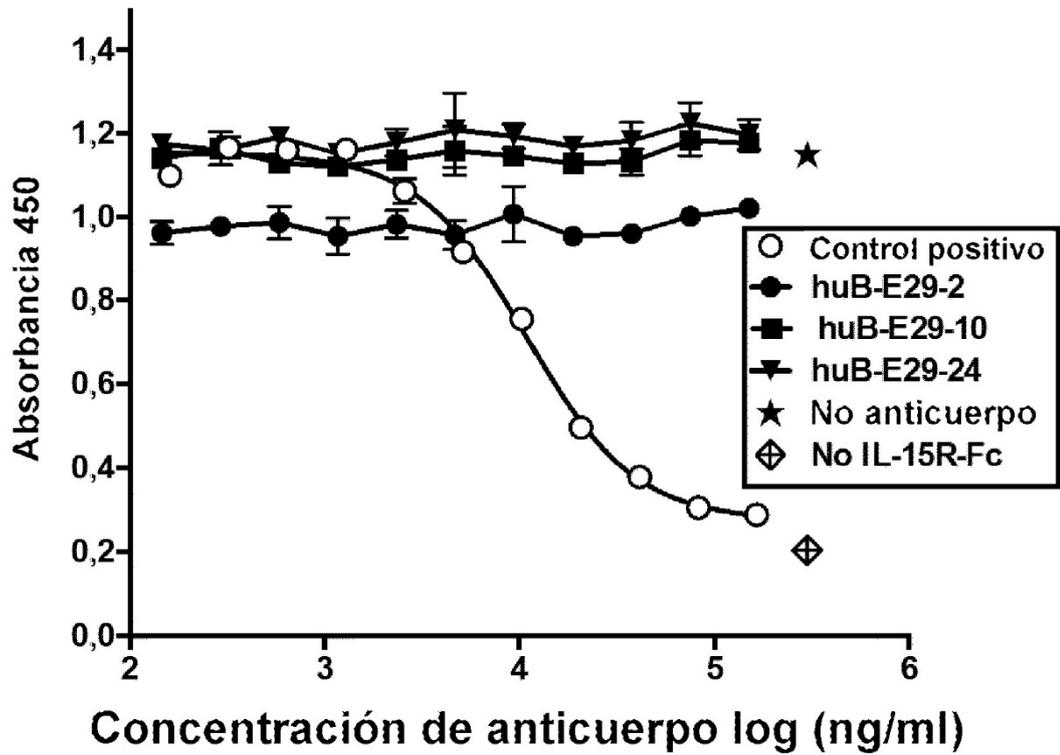


Figura 4

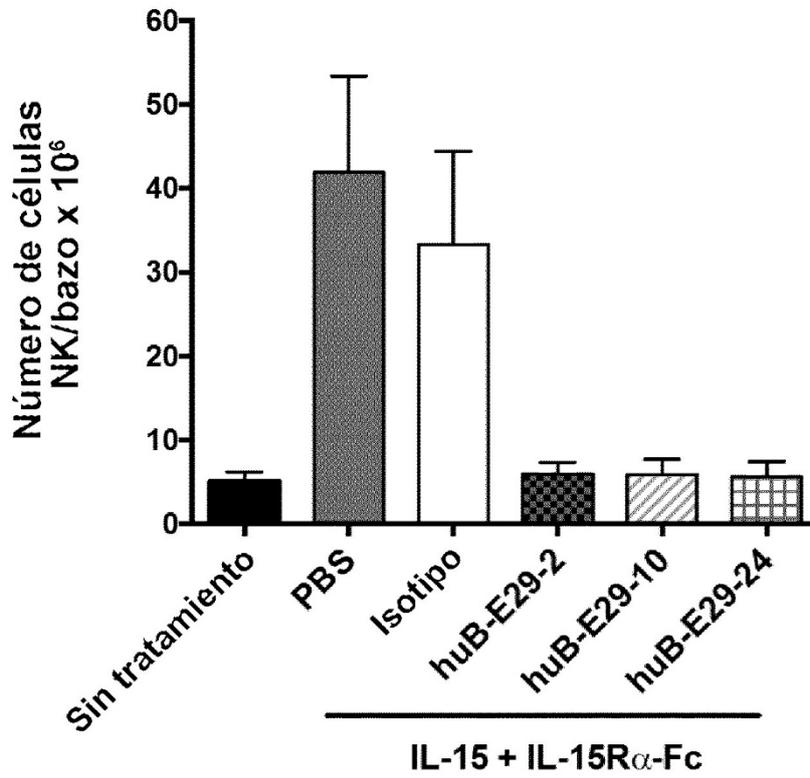


Figura 5

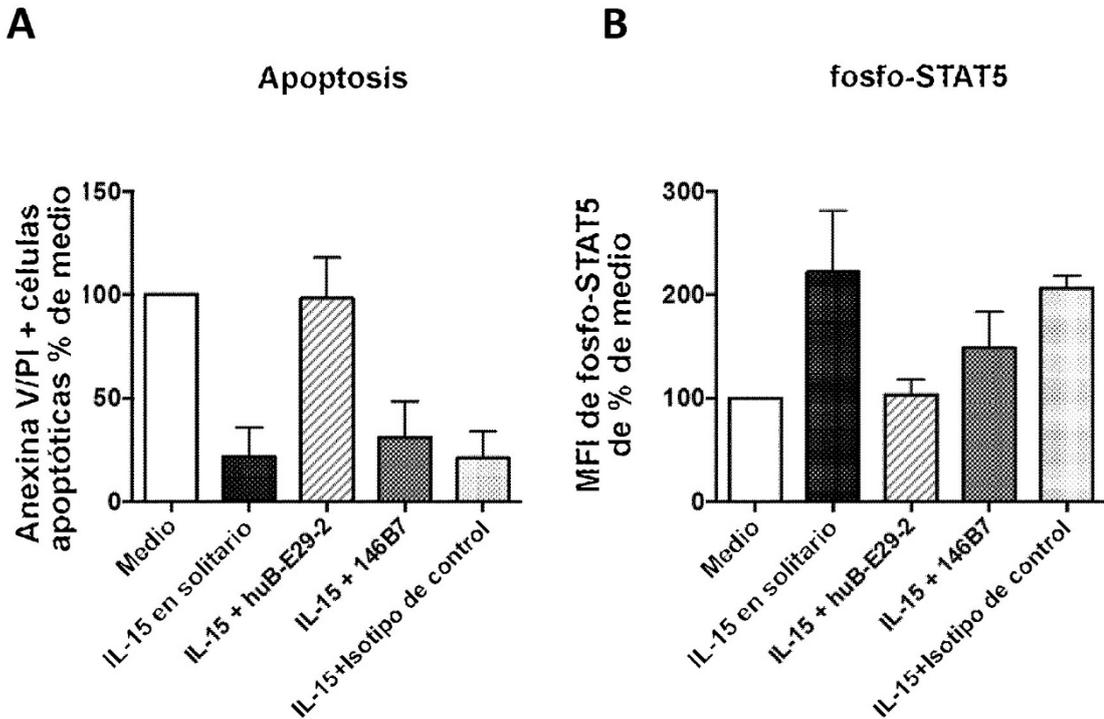


Figura 6

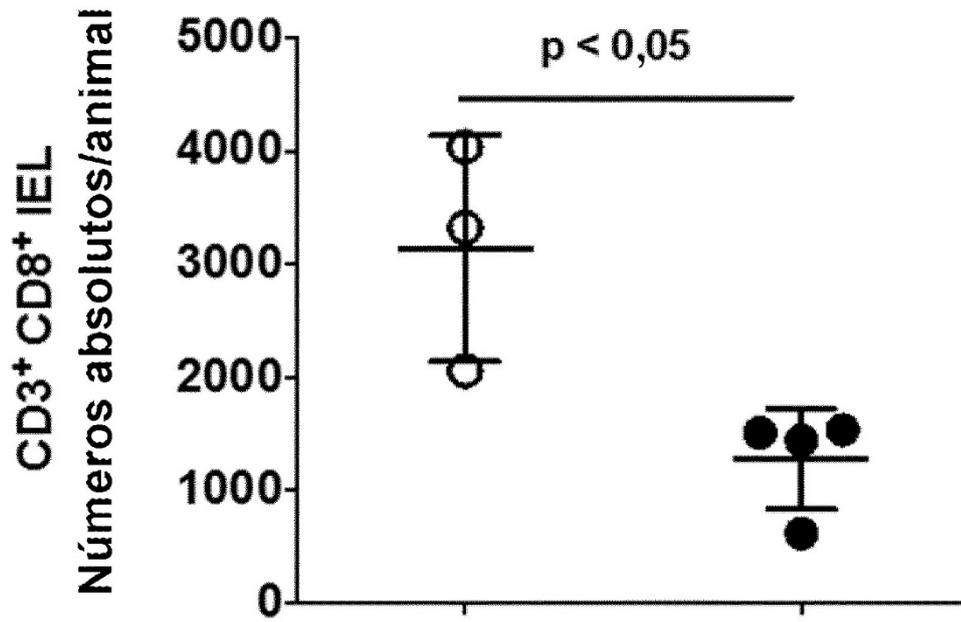


Figura 7