

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 508**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2017** **PCT/US2017/067917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018** **WO18119246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2017** **E 17883800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025** **EP 3558369**

54 Título: **Anticuerpos que se unen específicamente a IL-15 humana y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.12.2016 US 201662437143 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2025

73 Titular/es:

**CEPHALON LLC (100.00%)
145 Brandywine Parkway
West Chester, PA 19380, US**

72 Inventor/es:

**LAINÉ, DAVID JOSE SIMON;
POLLARD, MATTHEW;
DOYLE, ANTHONY GERARD;
POULTON, LYNN DOROTHY y
CLARKE, ADAM WILLIAM**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 026 508 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 que se unen específicamente a IL-15 humana y usos de los mismos

5 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] Esta solicitud incluye un Listado de Secuencias titulado 2873.273PC01_SequenceListing_ST25.text, generado el 18 de diciembre de 2017 con un tamaño de 215.523 bytes.

10 CAMPO

[0002] La divulgación se refiere en general al campo de la producción de anticuerpos recombinantes. Más concretamente, la divulgación se refiere a anticuerpos recombinantes que se unen específicamente a la IL-15 humana, ya sea sin complejos o en un complejo con el Receptor-alfa de IL-15.

15 FONDO

[0003] A lo largo de la especificación se citan diversas referencias, incluidas patentes, solicitudes de patentes publicadas, artículos técnicos, números de acceso a secuencias y otras referencias.

[0004] La citoquina interleucina 15 (IL-15) es un miembro de la superfamilia IL-2, que es secretada por un gran número de tipos celulares y tejidos, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), queratinocitos, fibroblastos y células nerviosas. La IL-15 se une a un complejo compuesto por la cadena beta del receptor de la IL-2 (CD122) y la cadena gamma común (gamma-C, CD132), y emite señales a través de él. *In vitro*, la IL-15 comparte varias actividades biológicas con la IL-2. *In vivo*, la especificidad para la IL-15 frente a la IL-2 la proporciona un receptor de cadena α privado único (IL-15R α) que completa el complejo receptor heterotrimérico de alta afinidad IL-15R α /IL-2R $\beta\gamma$.

[0005] La IL-15 se ha aislado de tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide y se ha informado de que induce citocinas y quimiocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α , la IL-1 β (Waldman TA (2004) Arthritis Res. Ther. 6:174-177). El bloqueo de la actividad de la IL-15 en un modelo de ratón xenoinjertado de psoriasis humana produjo una resolución de la psoriasis (Villadsen LS et al. (2003) J. Clin. Invest. 112:1571-80). Se notificaron niveles elevados del complejo IL-15 en pacientes con leucemia linfocítica granular de células T, linfoma de células T $\gamma\Delta/\Delta$ (Chen J et al. (2012) Blood. 119:137-143).

[0006] Utilizando ratones deficientes en IL-15, los investigadores también han demostrado que la inhibición de la vía de señalización de la IL-15 puede proporcionar beneficios profilácticos o terapéuticos en varias afecciones inmunomediadas, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE; un modelo de esclerosis múltiple), la colitis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis y la artritis.

[0007] En modelos de ratón, la sobreexpresión de IL-15 en células epiteliales intestinales desencadena una enteropatía de tipo celíaco. En los seres humanos, el aumento de la expresión de IL-15 es una característica distintiva de la enfermedad celíaca. La IL-15 se sobreexpresa tanto en la lámina propia como en el epitelio intestinal de los pacientes con enfermedad celíaca activa no tratada en comparación con los controles sanos y los pacientes celíacos tratados con dieta sin gluten, y los niveles de IL-15 en el intestino se correlacionan con el grado de daño de la mucosa (Abadie V et al. (2014) Immunol. Rev. 260:221-234).

[0008] DISC0280 es un potente anticuerpo anti-IL-15 con mecanismos de acción opuestos *in vitro* e *in vivo*. (Finch DK et al. (2011) Br. J. Pharmacol. 162:480-490). Desventajosamente, se encontró que DISC0280 se unía al sitio de unión del receptor α de IL-15 en IL-15, lo que permitía la trans-presentación de IL-15 por el DISC0280 *in vivo*, similar a la trans-presentación por el receptor α soluble de IL-15. Así pues, DISC0280 actúa como agonista de IL-15 *in vivo*.

[0009] Se han descrito dos anticuerpos anti-IL-15 capaces de neutralizar la actividad de IL-15 sin competir con la unión de IL-15 a IL-15R α . Un anticuerpo monoclonal anti-IL-15 totalmente humano, AMG 714 (Amgen) mostró mejoras en la actividad de la enfermedad en un ensayo de fase I-II de escalada de dosis en pacientes con artritis reumatoide activa (Baslund B et al. (2005) Arthritis Rheum. 52:2686-2692). También se ha descrito que un anticuerpo humanizado denominado huB-E29 bloquea la actividad de la IL-15 *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón sin competir con la unión de la IL-15 al IL-15R α (WO 16/001275).

[0010] Los ensayos clínicos que examinan nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad celíaca tienen como criterios de valoración: a) Atenuación de la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten, medida por la relación V/C. La V/C es la medida morfométrica de la longitud de las vellosidades del intestino delgado con respecto a la profundidad de las criptas tomada de una muestra de biopsia intestinal. (b) Atenuación de la inflamación de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten, medida por el recuento de linfocitos intraepiteliales (IEL) en secciones histológicas. (c) Atenuación de los anticuerpos séricos inducidos por el gluten, como los anticuerpos antigliadina y los autoanticuerpos contra la transglutaminasa. En la actualidad, ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz para tratar la

enfermedad celíaca según los criterios de valoración antes mencionados. Esta divulgación presenta anticuerpos que atenúan la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten (relación V/C mejorada), atenúan la inflamación de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten (recuentos de IEL reducidos) y atenúan los anticuerpos séricos inducidos por el gluten (anticuerpos antigliadina reducidos), medidos en un modelo de macaco rhesus de enfermedad celíaca. Los anticuerpos de esta divulgación presentan un nuevo tratamiento para pacientes con enfermedad celíaca y otras enfermedades inflamatorias en las que está implicada la IL-15.

RESUMEN

[0011] En un primer aspecto, la divulgación presenta anticuerpos que comprenden una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, cuyos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo que comprende el residuo Gln 108 de IL-15 humana (p. ej., en el que la IL-15 está complejada con IL-15R α). En algunas realizaciones, la IL-15 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 511. En algunas realizaciones, el epítipo puede comprender además los residuos Ser 7 y Asn 112 de la IL-15 humana (p. ej., cuando la IL-15 forma un complejo con la IL-15R α). En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene preferentemente una afinidad por el epítipo que comprende una KD de menos de aproximadamente $1,8 \times 10^{-9}$ M según se determina por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, el KD puede ser inferior a aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ M. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene preferiblemente una afinidad por el epítipo que comprende un KD de menos de aproximadamente 2×10^{-10} M según se determina por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, el KD puede ser de aproximadamente $1,6 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente $1,8 \times 10^{-10}$ M según lo determinado por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden inhibir la proliferación de células Natural Killer (NK), p. ej., células NK-92, a una IC₅₀ de menos de aproximadamente 900 pM en un ensayo de proliferación de células NK, incluyendo de aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 900 pM. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden inhibir la proliferación de células NK a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 60 pM en un ensayo de proliferación de células NK. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden inhibir la proliferación de células NK a una IC₅₀ de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 35 pM en un ensayo de proliferación de células NK. Los anticuerpos pueden inhibir la proliferación de células NK a una IC₅₀ de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 25 pM en un ensayo de proliferación de células NK. Los anticuerpos pueden ser capaces de neutralizar la IL-15. Los anticuerpos pueden ser capaces de disminuir las células NK circulantes.

[0012] En otro aspecto, la divulgación presenta anticuerpos que se unen específicamente a IL-15 humana, y que comprenden una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 17; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 20; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 25; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 28; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 29. La IL-15 humana puede formar un complejo con el receptor alfa de la IL-15. Los anticuerpos son antagonistas de la IL-15. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.

[0013] En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17, 20, 25, 28 y 29, respectivamente) pueden comprender una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29, respectivamente) pueden comprender una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 9. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29, respectivamente) pueden comprender una FR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 12, o SEQ ID N.º: Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.

[0014] En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29, respectivamente) pueden comprender una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 26 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25 o 26, 28, y 29 o 31, respectivamente) pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 455, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 456. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.

[0015] En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29,

- respectivamente) pueden comprender una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 30. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 27, 28, y 30, respectivamente) pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 457, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 458. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.
- [0016]** En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29, respectivamente) pueden comprender una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 29, donde Xaa5 de SEQ ID N.º: 29 es Phe (p. ej., SEQ ID N.º: 519). En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 27, 28, y 519, respectivamente) pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 459, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 460. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.
- [0017]** En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 25, 28 y 29, respectivamente, y opcionalmente una HFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12 o 13) puede comprender una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 26 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 30. En algunas realizaciones, (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 26, 28, y 30, respectivamente) los anticuerpos pueden comprender una HCDR2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18, y una FR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 13. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 o 18, 20, 26, 28, y 30, respectivamente, y opcionalmente una HFR3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12 o 13) puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 ó 18, 20, 26, 28 y 30, respectivamente, y opcionalmente una HFR3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12 ó 13 o anticuerpos que comprendan una región variable de cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4) pueden comprender una región variable de cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.
- [0018]** En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 17 20, 25, 28 y 29, respectivamente, y opcionalmente una HFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:12) puede comprender una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 19, una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27, una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31, y una FR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 14. En algunas realizaciones, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos que comprenden HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, 19, 20, 27, 28 y 31, y una HFR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:14) puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 7 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8, y/o puede comprender una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 9. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.
- [0019]** En otro aspecto, la divulgación presenta anticuerpos que se unen específicamente a IL-15 humana (por ejemplo, IL-15 complejada con IL-15R α), y que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 455. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 457. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden comprender una región variable de cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 459. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.

5 **[0020]** En otro aspecto, la divulgación presenta anticuerpos que se unen específicamente a IL-15 humana (p. ej., IL-15 complejada con IL-15R α), y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:8; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:503; una región variable de
10 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:505; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:507; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:509;
15 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:510; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:455; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID N.º:503; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:457; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:505; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de
25 aminoácidos de SEQ ID N.º:506; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:507; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:5; una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:509; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:510. Se proporcionan además polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos.

35 **[0021]** La secuencia consenso para la VH del anticuerpo es SEQ ID N.º: 1, y abarca la secuencia VH de SEQ ID N.º: 4 y SEQ ID N.º: 454. La secuencia consenso para la VL del anticuerpo es SEQ ID N.º: 2, y abarca la secuencia VL de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 455, SEQ ID N.º: 457, y SEQ ID N.º: 459. La secuencia consenso para la cadena L del anticuerpo es SEQ ID N.º: 3, y abarca la secuencia de la cadena L de SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 456, SEQ ID N.º: 458, y SEQ ID N.º: 460. La secuencia consenso para la FR3 VH del anticuerpo es SEQ ID N.º: 12, y abarca la secuencia VH FR3 de SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º: 14. La secuencia consenso para la CDR1 VH del anticuerpo es
40 SEQ ID N.º: 17, y abarca la secuencia VH de SEQ ID N.º: 18 y SEQ ID N.º: 19. La secuencia consenso para la CDR1 VL del anticuerpo es SEQ ID N.º: 25, y abarca la secuencia VH de SEQ ID N.º: 26 y SEQ ID N.º: 27. La secuencia consenso para la CDR3 VL del anticuerpo es SEQ ID N.º: 29, y abarca la secuencia VH de SEQ ID N.º: 30 y SEQ ID N.º: 31 y SEQ ID N.º:

45 **[0022]** Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede comprender un dominio constante IgG. En algunas realizaciones, el dominio constante IgG puede comprender un dominio constante IgG1. En algunas realizaciones, el dominio constante IgG1 puede comprender SEQ ID N.º: 32, SEQ ID N.º: 33, SEQ ID N.º: 34, SEQ ID N.º: 35, SEQ ID N.º: 36, SEQ ID N.º: 37, SEQ ID N.º: 38 o SEQ ID N.º: 39. En algunas realizaciones, el dominio
50 constante IgG puede comprender un dominio constante IgG2. En algunas realizaciones, el dominio constante IgG2 puede comprender SEQ ID N.º: 40, SEQ ID N.º: 41, SEQ ID N.º: 42 o SEQ ID N.º: 43. En algunas realizaciones, el dominio constante IgG puede comprender un dominio constante IgG4. En algunas realizaciones, el dominio constante IgG4 puede comprender SEQ ID N.º: 44, SEQ ID N.º: 45, SEQ ID N.º: 46, SEQ ID N.º: 47, SEQ ID N.º: 48, SEQ ID N.º: 49, SEQ ID N.º: 50 o SEQ ID N.º: 51.

55 **[0023]** Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) descritos o ejemplificados en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede formularse como una composición con un portador o excipiente. El portador puede ser un portador farmacéuticamente aceptable.

60 **[0024]** En algunas realizaciones, un método para tratar la enfermedad celíaca comprende administrar un anticuerpo que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) a un sujeto que lo necesita. La administración del anticuerpo IL-15 puede reparar la mucosa del intestino delgado en el sujeto. La administración del anticuerpo IL-15 puede aumentar la relación altura media de las vellosidades frente a la profundidad de las criptas (V/C) en el sujeto. La administración del anticuerpo IL-15 puede aumentar la altura de las vellosidades del intestino delgado en el sujeto. La administración del anticuerpo IL-15 puede disminuir los anticuerpos antigliadina en el sujeto. La administración del anticuerpo IL-15 puede
65 reparar la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten en un sujeto.

[0025] Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede administrarse como parte de un régimen de tratamiento a un sujeto que lo necesite. Así, en otro aspecto, la divulgación presenta métodos para tratar a un sujeto que los necesita con un anticuerpo IL-15. El sujeto es preferiblemente un ser humano. Los anticuerpos pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento para tratar cualquier enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria en la que la IL-15 esté desregulada, en particular, en la que la IL-15 esté regulada al alza.

[0026] En algunas realizaciones detalladas, el método puede ser para tratar la enfermedad celíaca, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un método para reparar la mucosa de un intestino delgado en un sujeto que tiene sensibilidad al gluten, alergia al gluten o enfermedad celíaca comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que el anticuerpo puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un método para aumentar la relación altura media de las vellosidades frente a la profundidad de las criptas (V/C) en un sujeto con sensibilidad al gluten, alergia al gluten o enfermedad celíaca comprende la administración al sujeto de cualquier anticuerpo descrito o ejemplificado en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un método para aumentar la altura de las vellosidades del intestino delgado en un sujeto que tiene sensibilidad al gluten, alergia al gluten o enfermedad celíaca comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que el anticuerpo puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un método para disminuir los anticuerpos antigliadina en un sujeto que lo necesita comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un método para reparar la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por gluten comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el sujeto tiene sensibilidad al gluten, alergia al gluten o enfermedad celíaca. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la enfermedad celíaca refractaria, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la artritis reumatoide, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la psoriasis, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la diabetes de tipo 1, y comprender la administración al sujeto de cualquier anticuerpo descrito o ejemplificado en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la alopecia areata, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar la leucemia linfocítica granular de células T, y comprender la administración al sujeto de cualquier anticuerpo descrito o ejemplificado en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con el receptor alfa de IL-15), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método puede ser para tratar o inhibir síntomas de exposición al gluten, p. ej., exposición al gluten en un paciente que tiene una sensibilidad o alergia al gluten, y comprende administrar al sujeto cualquier anticuerpo como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), que puede estar en una composición, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los síntomas de la exposición al gluten pueden incluir dolor muscular, dolor corporal, dolor articular, fatiga, hinchazón, gases, náuseas, calambres, estreñimiento, diarrea, erupciones cutáneas, dolor de cabeza,

migraña, depresión, ansiedad, niebla cerebral y/o irritabilidad. Véase, Biesiekierski JR (2015) United European Gastroenterol. J. 3:160-165.

[0027] Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede utilizarse en la fabricación de un medicamento. Cualquiera de estos anticuerpos puede utilizarse para tratar cualquier enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria en la que la IL-15 esté desregulada. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la enfermedad celíaca o en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad celíaca. Los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la enfermedad celíaca refractaria o en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad celíaca refractaria. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la artritis reumatoide o en la fabricación de un medicamento para tratar la artritis reumatoide. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la psoriasis o en la fabricación de un medicamento para tratar la psoriasis. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal o en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la diabetes tipo 1 o en la fabricación de un medicamento para tratar la diabetes tipo 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar la alopecia areata o en la fabricación de un medicamento para tratar la alopecia areata. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse para tratar la leucemia linfocítica granular de células T o en la fabricación de un medicamento para tratar la leucemia linfocítica granular de células T.

[0028] Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) según se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede utilizarse en un método *in vitro* para detectar IL-15 (opcionalmente complejada con IL-15R α) en una muestra de tejido aislada de un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto el anticuerpo con una muestra de tejido aislada de un sujeto para formar un complejo anticuerpo-IL-15 (opcionalmente complejado además con el Receptor-alfa de IL-15), y detectar el complejo en la muestra de tejido. Cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 descritos o ejemplificados en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores, puede utilizarse en un método *in vitro* para detectar el complejo IL-15 con el receptor α de IL-15 en una muestra de tejido aislada de un sujeto, que comprende poner en contacto el anticuerpo con una muestra de tejido aislada de un sujeto para formar un complejo anticuerpo-antígeno del anticuerpo con IL-15 y el complejo receptor α de IL-15, y detectar el complejo anticuerpo-antígeno en la muestra de tejido.

[0029] En otro aspecto, la divulgación presenta además células transformadas que expresan cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores. En algunas realizaciones, la célula transformada puede ser una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula de mamífero puede ser una célula de ovario de hámster chino.

[0030] En otro aspecto, la divulgación presenta además polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N.º: 517. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N.º: 518. También se proporcionan vectores que comprenden estos polinucleótidos. También se proporcionan células que comprenden estos polinucleótidos o vectores. También se proporcionan células que comprenden un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo que se une a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) como se describe o ejemplifica en el presente documento, incluidos los de cualquiera de los párrafos anteriores y un ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable del anticuerpo. El ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable pueden estar en el mismo vector o en vectores diferentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031]

La Figura 1 muestra la unión de los anticuerpos anti-IL-15 al complejo de IL-15 humana con el Receptor-alfa de IL-15, o IL-15R α no complejado. La unión de sobrenadantes de hibridoma representativos a IL-15R α humana recombinante no complejada o al complejo IL-15 recombinante con el receptor alfa de IL-15 se determinó mediante ELISA celular (ELISAc) y ELISA. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia relativa.

Las Figuras 2A y 2B muestran la inhibición dosis-respuesta de la proliferación de CTLL-2 mediada por IL-15 mediante anticuerpos anti-IL-15. La Figura 2A muestra la inhibición de la proliferación de CTLL-2 mediada por IL-15 mediante anticuerpos anti-IL-15 representativos diluidos a 2000, 200 y 20 pM, y la Figura 2B muestra la inhibición en una dosis-respuesta completa durante 72 horas. Los resultados se expresan en unidades de luminiscencia relativa.

La figura 3 muestra la inhibición de la proliferación de NK-92 mediada por IL-15 mediante anticuerpos anti-IL-15 representativos, AMG714 o control de isotipo (anti-KLH C3 IgG1). La lectura se realizó a las 72 horas y se expresa

en unidades de luminiscencia relativa. Los resultados se expresan como media \pm error de 3 réplicas.

Las Figuras 4-33 muestran los perfiles BIACORE® de las variantes anti-IL-15 detallando los niveles de captura del anticuerpo, las medidas de afinidad de punto único y los cambios de secuencia relativos al anticuerpo parental, el anticuerpo 4.

Las Figuras 34A, 34B y 34C muestran variantes del anticuerpo anti-IL-15, detallando sus sustituciones de aminoácidos de cadena pesada y ligera en relación con el anticuerpo original, el anticuerpo 4.

La Figura 35 muestra variantes del anticuerpo 4 con inhibición mejorada de la proliferación de NK-92 mediada por IL-15 en relación con el anticuerpo original, el anticuerpo 4, y otros anticuerpos anti-IL-15. La lectura se realizó a las 72 horas y se expresa en unidades de luminiscencia relativa.

La Figura 36 muestra la cinética de unión de las variantes del anticuerpo 4 y de la unión de AMG714 a IL-15 complejo con el receptor alfa de IL-15. La cinética de unión se determinó mediante resonancia de plasmón superficial en un sistema Biacore T200 (GE Healthcare). Las variantes del anticuerpo 4 se unieron al complejo IL-15 con mayor afinidad que el AMG714.

La Figura 37 muestra una comparación de anticuerpos anti-IL-15 en un ensayo basado en células NK-92. La inhibición de 25 pM de la proliferación de NK-92 mediada por el complejo IL-15 mediante anticuerpos anti-IL-15 durante 48 horas se expresa como unidades de luminiscencia relativa. Las variantes del anticuerpo 70 tienen una potencia similar entre sí y un valor IC-50 inferior al de AMG-714.

La figura 38 muestra que los residuos expuestos a la superficie en IL-15 se convirtieron en alanina mediante mutagénesis dirigida al sitio y se coexpresaron con IL-15R α humana en células F EXPI293®. La unión de anticuerpos anti-IL-15 a variantes purificadas de IL-15 se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial en un sistema BICAORE® T200 (GE Healthcare). AMG714 tenía una unión significativamente reducida o nula a E98A, Q101A, H105A o Q108A, caracterizada por una disociación rápida o una velocidad de disociación más rápida. El anticuerpo 70a presentaba una baja unión a Q108A, caracterizada por una tasa de asociación reducida y una disociación rápida.

Las Figuras 39A y 39B muestran las estructuras cristalinas del complejo anticuerpo 70a.FAb/IL-15 y del complejo cuaternario receptor de IL-15. (Figura 39A) Representación en dibujos animados de la región variable del anticuerpo 70a.FAb que une IL-15 humana, vistas frontal y lateral. (Figura 39B) La estructura cuaternaria del complejo funcional IL-15. Representación animada de IL-15 humana unida a IL-15R α , IL-2R β e IL-2R γ (código pdb, 4GS7). El anticuerpo 70a.FAb interrumpe la unión de IL-15 a IL-2R β e IL-2R γ . El anticuerpo 70a FAb se une a la IL-15 distalmente a la IL-15R α y es capaz de unirse al complejo IL-15/ IL-15R α .

Las Figuras 39C, 39D y 39E muestran los residuos de unión clave de la IL-15 que interactúan con el anticuerpo 70a, la IL-2R γ y la IL-2R β . Sólo se representan y numeran los residuos de IL-15 que entran en contacto con las respectivas proteínas asociadas mediante enlaces de hidrógeno. (Figura 39C) Residuos utilizados por IL-15 para interacciones con el Anticuerpo 70a FAb (Figura 39D) Residuos seleccionados de IL-15 que median el enlace de hidrógeno con IL-2R γ incluyendo Q108, N112. (Figura 39E) El residuo de IL-15, S7, realiza un enlace de hidrógeno con IL-2R β .

Las Figuras 39F, 39G y 39H muestran la estructura cristalina de la IL-15 humana con el anticuerpo 70a. (Figura 39F) Representación animada que muestra la unión del anticuerpo FAb a la IL-15 humana. (Figura 39G) Un triple motivo de tirosina que comprende Y52/54/56 en CDRH2 es un determinante clave de unión del anticuerpo con IL-15 humana. (Figura 39H) Un primer plano del motivo YYY del anticuerpo 70a que media las interacciones con la IL-15 humana. Este motivo vela y protege los residuos hidrofóbicos alrededor de la hélice 4 de la IL-15 impidiendo la solvatación. Las cadenas laterales de IL-15 y CDRH2 de los residuos implicados en esta interacción se indican en palitos blancos y negros, respectivamente.

La Figura 40 muestra la unión de las variantes del anticuerpo 70 a la IL-15 humana. Se evaluó la unión extracelular e intracelular de IL-15 por mAbs anti-IL-15 en subconjuntos de monocitos humanos: monocitos clásicos, intermedios y no clásicos. En el análisis se incluyó el control de isotipo Anti-KLH C3 IgG1 (relleno). Se muestran datos representativos del donante A.

La Figura 41 muestra la inhibición de la actividad de IL-15 en ratones por un anticuerpo anti-IL-15 ejemplar. Los resultados presentados son una enumeración de las células NK circulantes en el bazo de ratones inyectados con control vehicular o complejo IL-15/IL-15R α -Fc seguido de anticuerpo anti-IL-15 ejemplar o un control de isotipo Anti-KLH C3 IgG1. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de 8 animales por grupo.

La Figura 42 muestra la inhibición del número medio de células NK circulantes en monos cynomolgus mediante anticuerpos anti-IL-15 ejemplares. Enumeración de células NK medianas circulantes en monos cynomolgus inyectados con anticuerpos anti-IL-15 ejemplares probados a 10 mg/kg o 1 mg/kg. El número medio de células

NK circulantes se cuantificó mediante la expresión del marcador de células NK CD159a (NKG2A) y CD16. Los resultados se expresan como puntos temporales individuales para cada mono, con la línea continua indicando la mediana del número de células NK por grupo (n=4).

Las Figuras 43A, 43B y 43C muestran varias combinaciones de HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

Las Figuras 44A, 44B y 44C muestran varias combinaciones de LCDR1, LCDR2 y LCDR2.

La Figura 45A muestra el diseño del estudio del modelo de enfermedad celíaca del macaco rhesus indicando las etapas, los criterios de valoración y el tratamiento con el anticuerpo Anti-IL15 en dos grupos.

La Figura 45B muestra la atenuación de la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten mediante el tratamiento con Anti-IL15, medida por la relación entre la altura de las vellosidades del intestino delgado y la profundidad de las criptas (V/C). Para determinar las relaciones V/C se utilizaron biopsias de cuña de yeyuno intestinal recogidas de dos grupos de macacos en puntos temporales correspondientes a 6 meses de dieta GD, 35 días de tratamiento con aIL-15 en los macacos del grupo 1 (TD35) y 61 días de tratamiento en los macacos del grupo 2 (TD61).

La Figura 45C muestra la atenuación de la inflamación de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten mediante el tratamiento con Anti-IL15, medida por el recuento de linfocitos intraepiteliales (LIE) en secciones histológicas. Los puntos temporales reflejan 6 meses de dieta GD, 3 meses de dieta GFD, 35 días después del tratamiento Anti-IL15 en macacos del grupo 1 (TD35), y 61 días de tratamiento en macacos del grupo 2 (TD61). Las líneas azules discontinuas indican los controles de referencia sanos.

La Figura 45D muestra la atenuación de los anticuerpos séricos inducidos por el gluten (anticuerpos antigliadina) mediante el tratamiento con Anti-IL15. AGA son anticuerpos antigliadina; TG2 son autoanticuerpos antitransglutaminasa 2. Las distancias entre los puntos temporales corresponden a intervalos de dos semanas. Los niveles negativos de la línea de base se indican con líneas discontinuas. El inicio del tratamiento Anti-IL15 se indica con una flecha.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0032] A lo largo de la especificación y las reivindicaciones se utilizan diversos términos relacionados con aspectos de la divulgación. A menos que se indique lo contrario, estos términos tienen el significado habitual en la técnica. Los demás términos específicamente definidos deberán interpretarse de forma coherente con la definición que figura en el presente documento.

[0033] Tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que se indique expresamente lo contrario.

[0034] Los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente e incluyen a cualquier animal. Se prefieren mamíferos, incluidos mamíferos de compañía (*p. ej.*, gato, perro), mamíferos de granja (*p. ej.*, cerdo, caballo, vaca), roedores (*p. ej.*, ratones, conejos, ratas, cobayas) y primates no humanos. Se prefiere a los seres humanos.

[0035] Tal como se utiliza en el presente documento, "complejo IL-15" se refiere a la interacción entre la IL-15 y el Receptor alfa de la IL-15 (IL-15R α).

[0036] "Especificidad" en el contexto de las interacciones anticuerpo-antígeno no es necesariamente una designación absoluta, sino que puede constituir un término relativo que signifique el grado de selectividad de un anticuerpo para un antígeno. Especificidad de un anticuerpo para un antígeno mediada por las regiones variables del anticuerpo y, normalmente, por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo.

[0037] La divulgación proporciona anticuerpos producidos recombinantemente que se unen específicamente a la interleucina 15 (IL-15) humana libre (no compleja), así como a la IL-15 que se ha unido al receptor alfa de IL-15 (IL-15R α) - el complejo de IL-15. Los anticuerpos se unen a su antígeno con gran afinidad y reducen significativamente la proliferación de células inmunitarias mediada por la IL-15. Los anticuerpos antagonizan la IL-15.

[0038] En aspectos preferidos, los anticuerpos se unen a un epítipo de IL-15 humana (*p. ej.*, IL-15 humana complejada con IL-15R α) que incluye al menos la glutamina en la posición 108. El epítipo puede incluir además una o más de las serinas en la posición 7 y la asparagina en la posición 112 de la IL-15 humana (*p. ej.*, IL-15 humana complejada con IL-15R α).

[0039] El epítipo de una determinada interacción anticuerpo/antígeno puede dilucidarse utilizando diversos métodos experimentales de cartografía de epítopos. Los métodos experimentales incluyen la mutagénesis (incluido el barrido de alanina), la cristalografía de rayos X y otros métodos conocidos en la materia.

[0040] Un epítipo para la interacción entre el antígeno y el anticuerpo puede incluir las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción antígeno-anticuerpo. El epítipo puede caracterizarse por las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre el antígeno y el anticuerpo. El epítipo puede caracterizarse por los residuos de aminoácidos definidos por un criterio específico, p. ej., por la distancia entre átomos (p. ej., átomos no de hidrógeno).

[0041] En el contexto de una estructura cristalina derivada de rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un anticuerpo, p. ej., un fragmento de FAb, y su antígeno, el término epítipo incluye residuos de IL-15 caracterizados por tener enlaces de hidrógeno mediados por agua entre pares de átomos; enlaces de hidrógeno de heteroátomos entre 2,5- 3,5 Å; o un enlace de hidrógeno correspondiente a un átomo donante/aceptor dentro de un anillo aromático. Alternativamente, se considera que un determinado residuo de aminoácido de la IL-15 forma parte de un epítipo si participa en una interacción hidrofóbica o en interacciones de van der Waals entre pares de átomos.

[0042] El epítipo también puede incluir más genéricamente residuos de aminoácidos para los que la sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno (p. ej., utilizando la exploración de alanina). Pueden realizarse experimentos de mutagénesis de barrido de alanina utilizando una IL-15 mutante en la que varios residuos del polipéptido IL-15 han sido sustituidos por alanina. Mediante la evaluación de la unión del anticuerpo a la IL-15 mutante, se puede evaluar la importancia de los residuos particulares de IL-15 para la unión del anticuerpo. Sin embargo, si el enterramiento de una cadena lateral no polar se produce durante la unión del antígeno y el anticuerpo y da lugar al empaquetamiento de la cadena lateral contra el antígeno, entonces una mutación de alanina en esta posición podría no tener un gran impacto en la unión. Puede ser que aunque un mutante de alanina dé lugar a una unión reducida por parte del anticuerpo, esto no signifique que el residuo esté haciendo contacto, sino más bien que la estructura tridimensional local de la IL-15 podría verse perturbada por la introducción de una alanina. Puede ser necesario un análisis estructural adicional del complejo, por ejemplo mediante cristalografía de rayos X, para evaluar los residuos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno.

[0043] Los anticuerpos anti-IL-15 son preferiblemente capaces de inhibir, reducir o prevenir la proliferación de células inmunitarias, como las células asesinas naturales (NK) y las células T CD8⁺. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-IL-15 inhiben la proliferación a una IC₅₀ de menos de aproximadamente 900 pM en un ensayo de proliferación NK. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-IL-15 inhiben la proliferación a una IC₅₀ de más de 0 pM y menos de aproximadamente 900 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden inhibir la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 500 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden inhibir la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 250 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden inhibir la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 200 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden inhibir la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 150 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden inhibir la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 inhiben preferentemente la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 60 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 inhiben preferentemente la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 35 pM en un ensayo de proliferación NK. Los anticuerpos anti-IL-15 inhiben preferentemente la proliferación a una IC₅₀ de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 30 pM en un ensayo de proliferación NK.

[0044] Como parte de un ensayo de proliferación NK adecuado, células como las células CTLL-2, pueden cultivarse e inducirse a proliferar utilizando una concentración adecuada de un complejo de IL-15 y el Receptor alfa de IL-15. Así pues, puede utilizarse un ensayo de proliferación de CTLL-2 para determinar la IC₅₀ de los anticuerpos para la inhibición de la proliferación. Cualquiera de los anticuerpos anti-IL-15 descritos o ejemplificados en el presente documento se añaden al cultivo celular, y a continuación las células se incuban durante un periodo de tiempo adecuado, incluyendo 48 horas, y se evalúa a partir de entonces la proliferación o inhibición de la proliferación debido a la presencia de los anticuerpos, incluyendo mediante un ensayo de viabilidad celular.

[0045] Como se describe o ejemplifica en el presente documento, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FR pueden estar de acuerdo con Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991 (también referido en el presente documento como el sistema de numeración Kabat). Además, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR pueden ser conformes al Enhanced Chothia Numbering Scheme (www.bioinfo.org.uk/mdex.html).

[0046] De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, las FR y CDR de VH pueden posicionarse como sigue: residuos 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) y 103- 113 (FR4), y las FR y CDR de VL se posicionan como sigue: residuos 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) y 98-107 (FR4). En algunos casos, las regiones variables pueden aumentar en longitud y, según el sistema de numeración de Kabat, algunos aminoácidos pueden designarse con un número seguido de una letra. Esta especificación no se limita a las FR y CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat, sino que incluye todos los sistemas de numeración, incluido el sistema de numeración canónico o de Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-17; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-83; and/or Al-Lazikani et al. (1997) J. Mol. Biol. 273:927-48; el sistema de numeración de Honnegger et al. (2001) J. Mol. Biol., 309:657-70; o el sistema IMGT analizado en Giudicelli et al. (1997)

Nucleic Acids Res. 25:206-11. En aspectos preferidos, las CDR se definen según el sistema de numeración Kabat.

[0047] En algunos aspectos particulares, para cualquiera de los subdominios CDR2 de cadena pesada descritos en el presente documento, según el sistema de numeración de Kabat, los cinco aminoácidos C-terminales pueden no participar directamente en la unión a antígeno y, en consecuencia, se entenderá que uno o más de estos cinco aminoácidos C-terminales pueden sustituirse por otro aminoácido natural sin afectar sustancialmente de forma adversa a la unión a antígeno. En algunos aspectos, para cualquiera de los subdominios CDR1 de cadena ligera descritos en el presente documento, según el sistema de numeración de Kabat, los cuatro aminoácidos N-terminales pueden no participar directamente en la unión a antígeno y, en consecuencia, se entenderá que cualquiera de uno o más de estos cuatro aminoácidos puede sustituirse por otro aminoácido natural sin afectar sustancialmente de forma adversa a la unión a antígeno. Por ejemplo, como describen Padlan et al. (1995) FASEB J. 9:133-139, es posible que los cinco aminoácidos terminales C de la CDR2 de la cadena pesada y/o los cuatro aminoácidos terminales N de la CDR1 de la cadena ligera no participen en la unión al antígeno. En algunos aspectos, tanto la CDR2 de la cadena pesada como la CDR1 de la cadena ligera no participan directamente en la unión al antígeno.

[0048] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (por ejemplo, IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 17 y una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 20. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 19, y en algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18. Los anticuerpos pueden comprender una FR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 12, SEQ ID N.º: 13 o SEQ ID N.º: 14. Los anticuerpos pueden comprender además una región variable de cadena ligera o una cadena ligera. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 455, SEQ ID N.º: 457 o SEQ ID N.º: 459. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 503, SEQ ID N.º: 505, SEQ ID N.º: 506, SEQ ID N.º: 507, SEQ ID N.º: 509, o SEQ ID N.º: 510. La cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 456, SEQ ID N.º: 458 o SEQ ID N.º: 460.

[0049] La CDR 1 de región variable de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º: 453 o SEQ ID N.º: 52 hasta SEQ ID N.º: 135. La CDR2 de la región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 136 hasta SEQ ID N.º: 226. La CDR3 de la región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 227 hasta SEQ ID N.º: 272. En las Figuras 43A a 43C se muestran combinaciones adecuadas de dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada. Los anticuerpos que comprenden dichos dominios CDR1, CDR2 o CDR3 de región variable de cadena pesada, o los anticuerpos que comprenden las combinaciones de dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de región variable de cadena pesada mostrados en las Figuras 43A a 43C pueden comprender además una región variable de cadena ligera o una cadena ligera. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 455, SEQ ID N.º: 457 o SEQ ID N.º: 459. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 503, SEQ ID N.º: 505, SEQ ID N.º: 506, SEQ ID N.º: 507, SEQ ID N.º: 509, o SEQ ID N.º: 510. La cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 456, SEQ ID N.º: 458 o SEQ ID N.º: 460.

[0050] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (por ejemplo, IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 25, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 28, y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 29. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27, y en algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 26. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31, y en algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 30. Los anticuerpos pueden comprender además una región variable de cadena pesada. La región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 7 o SEQ ID N.º: 454.

[0051] La CDR 1 de región variable de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID N.º: 273 hasta SEQ ID N.º: 329. La CDR2 de la región variable de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 330 hasta SEQ ID N.º: 390. La CDR3 de la región variable de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 391 hasta SEQ ID N.º: 452. En las Figuras 44A a 44C se muestran combinaciones adecuadas de dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera. Los anticuerpos que comprenden tales dominios CDR1, CDR2, o CDR3 de región variable de cadena

de SEQ ID N.º: 16, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 20, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 28, y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 29 donde Xaa5 de SEQ ID N.º: 29 es F (SEQ ID N.º: 519). Los anticuerpos pueden comprender además una FR3 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 12 o SEQ ID N.º: 13.

[0059] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18, y una región variable de cadena ligera o una cadena ligera. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 455, SEQ ID N.º: 457 o SEQ ID N.º: 459. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 503, SEQ ID N.º: 505, SEQ ID N.º: 506, SEQ ID N.º: 507, SEQ ID N.º: 509, o SEQ ID N.º: 510. La cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 456, SEQ ID N.º: 458 o SEQ ID N.º: 460.

[0060] Los anticuerpos pueden unirse específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprender, o comprender además una región variable de cadena pesada que comprende los subdominios que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en la siguiente tabla:

	FR1	H1	FR2	H2	FR3	H3	FR4
SEQ ID NO:	10	16	11	19	14	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	14	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15

[0061] Los anticuerpos pueden unirse específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprender, o comprender además una región variable de cadena ligera que comprende los subdominios que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en la siguiente tabla:

	FR1	L1	FR2	L2	FR3	L3	FR4
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	26	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	30	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	519	24
SEQ ID NO:	21	26	22	28	23	30	24

[0062] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 7. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 454. Los anticuerpos pueden comprender además una región variable de cadena ligera o una cadena ligera. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 454, SEQ ID N.º: 457 o SEQ ID N.º: 459. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 503, SEQ ID N.º: 505, SEQ ID N.º: 506, SEQ ID N.º: 507, SEQ ID N.º: 509 o SEQ ID N.º: 510. La cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 456, SEQ ID N.º: 458 o SEQ ID N.º: 460.

[0063] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2. En algunos aspectos preferidos, los anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la

[illegible]

algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 461, SEQ ID N.º: 462, SEQ ID N.º: 463, SEQ ID N.º: 464, SEQ ID N.º: 465, SEQ ID N.º: 466, SEQ ID N.º: 467, SEQ ID N.º: 468, SEQ ID N.º: 469, SEQ ID N.º: 470, SEQ ID N.º: 471, SEQ ID N.º: 472, SEQ ID N.º: 473, SEQ ID N.º: 474, SEQ ID N.º: 475, SEQ ID N.º: 476, SEQ ID N.º: 477, SEQ ID N.º: 478, SEQ ID N.º: 479, SEQ ID N.º: 480, SEQ ID N.º: 481, SEQ ID N.º: 482, SEQ ID N.º: 483, SEQ ID N.º: 484, SEQ ID N.º: 485, SEQ ID N.º: 486, SEQ ID N.º: 487, SEQ ID N.º: 488, SEQ ID N.º: 489 o SEQ ID N.º: 490, y una región variable de cadena ligera o una cadena ligera, y la región variable de cadena ligera puede ser cualquiera de los SEQ ID N.º: 491, SEQ ID N.º: 492, SEQ ID N.º: 493, SEQ ID N.º: 494, SEQ ID N.º: 495, SEQ ID N.º: 496, SEQ ID N.º: 497, SEQ ID N.º: 498 o SEQ ID N.º: 499. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID N.º: 491, SEQ ID N.º: 492, SEQ ID N.º: 493, SEQ ID N.º: 494, SEQ ID N.º: 495, SEQ ID N.º: 496, SEQ ID N.º: 497, SEQ ID N.º: 498 o SEQ ID N.º: 499, y una región variable de la cadena pesada. Los anticuerpos que comprenden tales pares de región variable de cadena pesada y cadena ligera se unen preferentemente de forma específica a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α).

[0070] En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID N.º:7, SEQ ID N.º:454 y SEQ ID N.º:4, y una región variable de cadena ligera o una cadena ligera. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID N.º:7, SEQ ID N.º:454, y SEQ ID N.º:4, y una región variable de cadena ligera o una cadena ligera, y la región variable de cadena ligera puede ser cualquiera de SEQ ID N.º:5, SEQ ID N.º:8, SEQ ID N.º:455, SEQ ID N.º:457, SEQ ID N.º:459, SEQ ID N.º:503, SEQ ID N.º:505, SEQ ID N.º:506, SEQ ID N.º:507, SEQ ID N.º:509, o SEQ ID N.º:510. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID N.º:5, SEQ ID N.º:8, SEQ ID N.º:455, SEQ ID N.º:457, SEQ ID N.º:459, SEQ ID N.º:503, SEQ ID N.º:505, SEQ ID N.º:506, SEQ ID N.º:507, SEQ ID N.º:509, o SEQ ID N.º:510 y una región variable de cadena pesada.

[0071] Los anticuerpos pueden unirse específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprender VH y VL o par de cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en la siguiente tabla:

	VH	VL	L
SEQ ID NO:	7	8	9
SEQ ID NO:	454	8	9
SEQ ID NO:	4	455	458
SEQ ID NO:	4	457	458
SEQ ID NO:	4	459	460
SEQ ID NO:	4	5	6

[0072] Los anticuerpos pueden unirse específicamente a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α), y comprender VH y VL o par de cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en la siguiente tabla:

	VH	VL
SEQ ID NO:	4	8
SEQ ID NO:	4	503
SEQ ID NO:	4	505
SEQ ID NO:	4	509
SEQ ID NO:	4	510
SEQ ID NO:	454	455
SEQ ID NO:	454	503
SEQ ID NO:	454	457
SEQ ID NO:	454	505
SEQ ID NO:	454	406
SEQ ID NO:	454	507
SEQ ID NO:	454	5
SEQ ID NO:	454	509
SEQ ID NO:	454	510

[0073] Cualquiera de los anticuerpos aquí descritos o ejemplificados se une a la IL-15, que es preferentemente IL-15 humana. Los anticuerpos pueden unirse a la IL-15 no complejada o a la IL-15 cuando está en un complejo con el receptor alfa de la IL-15 (IL-15R-alfa o IL-15R α) - el complejo IL-15. En algunos aspectos, la IL-15 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 511. En algunos aspectos, la IL-15R-alfa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 512, sin las marcaciones AVI e His. En algunos aspectos, la IL-15R-alfa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 520.

[0074] Los anticuerpos pueden tener una afinidad con IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) con una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 1×10^{-2} M. En algunas realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-3} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-4} M. En algunas realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-5} M. En otras realizaciones adicionales, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-6} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-7} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-9} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-10} M. En otras realizaciones adicionales, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-11} M. En algunas realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-12} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-13} M. En otras realizaciones, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-11} M. En otras realizaciones adicionales, la KD es de menos de aproximadamente 1×10^{-15} M. En algunos aspectos, la KD es de menos de aproximadamente $1,8 \times 10^{-9}$ M. En algunos aspectos, la KD es de aproximadamente $1,2 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente 2×10^{-10} M. En algunos aspectos, la KD es de aproximadamente $1,3 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente $1,9 \times 10^{-10}$ M. En algunos aspectos, la KD es de aproximadamente $1,33 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente $1,93 \times 10^{-10}$ M. En algunos aspectos, la KD es de aproximadamente $1,6 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente $1,8 \times 10^{-10}$ M. En algunos aspectos, la KD es de aproximadamente $1,7 \times 10^{-10}$ M. Los valores de afinidad se refieren a los obtenidos mediante metodologías estándar, incluida la resonancia de plasmón superficial (SPR) como los análisis BIACORE® o el análisis mediante un sistema Dip-and-Read OCTET® Red 96 (Forte Bio). En una realización preferida, la constante de disociación se determina mediante SPR.

[0075] En un análisis BIACORE® SPR general, un anticuerpo es inmovilizado en la superficie de un chip sensor, y concentraciones adecuadas de IL-15 o la IL-15 complejada con el Receptor alfa de IL-15 son pasadas a través de la superficie. Se detectan los cambios en el índice de refracción y se utiliza un software para generar sensorgramas para su análisis. La interacción entre el anticuerpo inmovilizado y la IL-15 o el complejo de IL-15 puede llevarse a cabo durante cualquier periodo de tiempo adecuado, incluyendo de 1 a 2 minutos aproximadamente. La temperatura de la interacción puede ser cualquier temperatura adecuada, incluyendo unos 25 grados C.

[0076] Los anticuerpos que se unen a IL-15 (p. ej., IL-15 humana complejada con IL-15R α) pueden ser anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos de longitud completa que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden derivados o fragmentos o porciones de anticuerpos que conservan la especificidad de unión al antígeno, y también preferiblemente conservan sustancialmente la afinidad, de la molécula de anticuerpo madre de longitud completa (p. ej., para IL-15). Por ejemplo, los derivados pueden comprender una única región variable (ya sea una región variable de cadena pesada o de cadena ligera). Otros ejemplos de derivados y fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos con especificidad poliepitópica,

diabodies, minicuerpos, moléculas FAb, F(Ab')₂, Fd, Fabc y moléculas Fv, anticuerpos de cadena simple (Sc), anticuerpos Fv de cadena simple (scFv), cadenas ligeras individuales de anticuerpos, cadenas pesadas individuales de anticuerpos, fusiones entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, monómeros o dímeros de cadenas pesadas, monómeros o dímeros de cadenas ligeras, dímeros formados por una cadena pesada y una ligera, y otros multímeros. Los anticuerpos Fv de cadena simple pueden ser polivalentes. Los derivados, fragmentos y/o porciones de anticuerpos pueden ser producidos y expresados recombinantemente por cualquier tipo celular, procariota o eucariota.

[0077] En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera consta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Normalmente, es menos probable que las propiedades de unión al antígeno de un anticuerpo se vean alteradas por cambios en las secuencias FR que por cambios en las secuencias CDR. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (*p. ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

[0078] Los anticuerpos anti-IL-15 son preferiblemente totalmente humanos. Los anticuerpos totalmente humanos son aquellos en los que toda la molécula es humana o de origen humano, o incluye una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo. Los anticuerpos totalmente humanos incluyen los obtenidos a partir de una biblioteca de genes V humanos, por ejemplo, en la que se expresan recombinantemente genes humanos que codifican regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos totalmente humanos pueden expresarse en otros organismos (*p. ej.*, ratones y tecnología xenomouse) o células de otros organismos transformadas con genes que codifican anticuerpos humanos. Los anticuerpos totalmente humanos pueden expresarse en un sistema OMNIRAT[®] para ratas (OMT, Inc.), según el documento WO 08/151081. no obstante, los anticuerpos totalmente humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas naturales, *p. ej.*, mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio.

[0079] En algunos aspectos, los anticuerpos anti-IL-15 pueden comprender estructuras proteicas no derivadas de inmunoglobulina. Por ejemplo, puede hacerse referencia a (Ku et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556), que describe un haz de cuatro hélices de la proteína citocromo b562 que tiene dos bucles aleatorizados para crear CDR, que han sido seleccionados para la unión a antígenos.

[0080] Los anticuerpos anti-IL-15 pueden incluir modificaciones o elementos postraduccionales que pueden afectar a la actividad del anticuerpo, la semivida circulante o la estabilidad de almacenamiento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar metilados, acetilados, glicosilados, sulfatados, fosforilados, carboxilados y/o amidados, o pueden comprender otras moléculas adecuadas bien conocidas en la técnica. Los enlaces incluyen cualquier grupo químico o combinaciones de grupos que se encuentren habitualmente en las moléculas de inmunoglobulina en circulación o que se añadan a los anticuerpos mediante sistemas de expresión recombinante, incluidos los sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos.

[0081] Ejemplos de modificaciones de cadenas laterales contempladas por la divulgación incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora por reacción con un aldehído seguida de reducción con NaBH₄; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2, 4, 6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguida de reducción con NaBH₄.

[0082] El grupo guanidina de los residuos de arginina puede modificarse mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos como 2,3-butanediona, fenilgloxal y gloxal. El grupo carboxilo puede modificarse mediante la activación con carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguida de la posterior derivación, por ejemplo, a una amida correspondiente. Los grupos sulfidrílo pueden modificarse por métodos como la carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; la oxidación del ácido per fórmico a ácido cisteico; la formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiólicos; la reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales utilizando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino. Los residuos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencil o haluros de sulfenilo. Por otra parte, los residuos de tirosina pueden alterarse mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina. La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede llevarse a cabo mediante alquilación con derivados del ácido yodoacético o N-carbetoxilación con dietilpirocarbonato.

[0083] Los anticuerpos anti-IL-15 pueden incluir modificaciones que modulen la semivida sérica y la biodistribución, incluyendo sin limitación, modificaciones que modulen la interacción del anticuerpo con el receptor Fc neonatal (FcRn),

- un receptor con un papel clave en la protección de la IgG frente al catabolismo, y en el mantenimiento de una alta concentración sérica de anticuerpos. Las modificaciones moduladoras de la semivida sérica pueden producirse en la región Fc de IgG1, IgG2 o IgG4, incluida la triple sustitución de M252Y/S254T/T256E (numeración según el sistema de numeración de la UE (Edelman, GM et al. (1969) Proc. Natl. Acad. USA 63:78-85)), como se describe en Pat. de EE.UU. N.º 7,083,784. Pueden producirse otras sustituciones en las posiciones 250 y 428, véase, *p. ej.*, Pat. de EE.UU. N.º 7.217.797, así como en las posiciones 307, 380 y 434, véase, *p. ej.*, PCT Publ. N.º WO 00/042072. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos de dominio constante que modulan la unión a receptores Fc y la función subsiguiente mediada por estos receptores, incluyendo la unión a FcRn y la semivida sérica, se describen en la Pub. de EE. UU. N.º 2009/0142340, 2009/0068175, y 2009/0092599. Los anticuerpos de cualquier clase pueden tener la lisina C-terminal de la cadena pesada omitida o eliminada para reducir la heterogeneidad (Δ K). La sustitución de S228P (numeración UE) en la IgG4 humana puede estabilizar el intercambio del brazo Fab del anticuerpo *in vivo* (Labrin et al. (2009) Nature Biotechnol. 27:8; 767-773), y esta sustitución puede estar presente al mismo tiempo que las modificaciones M252Y/S254T/T256E y/o Δ K.
- [0084]** Los anticuerpos anti-IL-15 comprenden preferentemente dominios constantes humanos. Los dominios constantes de cadena pesada son preferentemente dominios constantes IgG1, IgG2 o IgG4 humanos. Los dominios constantes de la cadena ligera son preferiblemente dominios constantes lambda humanos.
- [0085]** Las regiones constantes IgG1 de cadena pesada humana que pueden utilizarse con los anticuerpos anti-IL-15 pueden seleccionarse entre IgG1 humana (SEQ ID N.º: 32), IgG1 humana (Δ K) (SEQ ID N.º: 33), IgG1 humana 252Y/254T/256E (SEQ ID N.º: 34), IgG1 humana 252Y/254T/256E (Δ K) (SEQ ID N.º: 35), IgG1 humana L235A/G237A (SEQ ID N.º: 36), IgG1 humana L235A/G237A (Δ K) (SEQ ID N.º: 37) human IgG1 L234A/L235A/G237A (SEQ ID N.º: 38), e IgG1 humana L234A/L235A/G237A (Δ K) (SEQ ID N.º: 39). Las regiones constantes IgG2 de cadena pesada humana que pueden utilizarse con los anticuerpos anti-IL-15 pueden seleccionarse entre IgG2 humana (SEQ ID N.º: 40), IgG2 humana (Δ K) (SEQ ID N.º: 41), IgG2 humana A330S/P331S (SEQ ID N.º: 42), e IgG humana (Δ K) (SEQ ID N.º: 43). Las regiones constantes de IgG4 humana de cadena pesada que pueden utilizarse con los anticuerpos anti-IL-15 pueden seleccionarse entre IgG4 humana (SEQ ID N.º: 44), IgG4 humana (Δ K) (SEQ ID N.º: 45), IgG4 humana S228P (SEQ ID N.º: 46), IgG4 humana S228P (Δ K) (SEQ ID N.º: 47), IgG4 humana 228P/252Y/254T/256E (SEQ ID N.º: 48), IgG4 humana 228P/252Y/254T/256E (Δ K) (SEQ ID N.º: 49), IgG4 humana 252Y/254T/256E (SEQ ID N.º: 50), e IgG4 humana 252Y/254T/256E (Δ K) (SEQ ID N.º: 51).
- [0086]** Los anticuerpos anti-IL-15 pueden marcarse, unirse o conjugarse con cualquier molécula química o biomolecular. Los anticuerpos marcados pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación básica. Dichas marcaciones/conjugados pueden ser detectables, como fluorocromos, sondas electroquimioluminiscentes, puntos cuánticos, radiomarcadores, enzimas, proteínas fluorescentes y proteínas luminiscentes, o pueden comprender biotina o PEG.
- [0087]** Los anticuerpos pueden derivatizarse mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos para evitar la escisión proteolítica o mejorar la actividad o la estabilidad.
- [0088]** Las secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos anti-IL-15, sus dominios (*p. ej.*, dominios VH y VL), y sus subdominios (*p. ej.*, FR y CDR) se presentan en la divulgación. Los polinucleótidos incluyen, entre otros, ARN, ADN, ADNc, híbridos de ARN y ADN, y cadenas simples, dobles o triples de ARN, ADN o sus híbridos. Las secuencias complementarias de ácido nucleico también están dentro del alcance de la divulgación.
- [0089]** En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 4, o SEQ ID N.º: 7. El polinucleótido puede comprender además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, o SEQ ID N.º: 8. El polinucleótido puede comprender además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 6, o SEQ ID N.º: 9. El polinucleótido puede comprender además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de anticuerpo, tal como cualquiera de las regiones constantes IgG1, IgG2 o IgG4 descritas en el presente documento.
- [0090]** En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 7, o SEQ ID N.º: El polinucleótido puede comprender además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º:455, SEQ ID N.º:457, SEQ ID N.º:459, SEQ ID N.º:503, SEQ ID N.º:505, SEQ ID N.º:506, SEQ ID N.º:507, SEQ ID N.º:509 o SEQ ID N.º:510. El polinucleótido puede comprender además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º:456, SEQ ID N.º:458, o SEQ ID N.º:460. El polinucleótido puede comprender además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de anticuerpo, tal como cualquiera de las regiones constantes IgG1, IgG2 o IgG4 descritas en el presente documento.

- 5 **[0091]** En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 5, o SEQ ID N.º: 8. En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 6, o SEQ ID N.º: 9. En algunos aspectos, un polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N.º: 517. En algunos aspectos, un polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N.º: 518.
- 10 **[0092]** En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º:455, SEQ ID N.º:457, SEQ ID N.º:459, SEQ ID N.º:503, SEQ ID N.º:505, SEQ ID N.º:506, SEQ ID N.º:507, SEQ ID N.º:509 o SEQ ID N.º:510. En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º:456, SEQ ID N.º:458, o SEQ ID N.º:460.
- 15 **[0093]** Cualquiera de estos polinucleótidos puede estar incluido en un vector. Así, se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos como parte de la divulgación. Los vectores pueden ser vectores de expresión. De este modo, se proporcionan vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, entre otras, secuencias reguladoras, un marcador de selección, una etiqueta de purificación o una señal de poliadenilación. Dichos elementos reguladores pueden incluir un promotor transcripcional, potenciadores, sitios de unión ribosomal del ARNm o secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.
- 20 **[0094]** Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos, pueden incluir uno o más elementos no transcritos, como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados ligados al gen que se va a expresar, otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', secuencias no traducidas 5' o 3' (como sitios de unión a ribosomas necesarios), un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de empalme o secuencias de terminación transcripcional. También puede incorporarse un origen de replicación que confiera la capacidad de replicarse en un hospedador específico.
- 25 **[0095]** Los vectores pueden usarse para transformar cualquiera de una amplia gama de células huésped bien conocidas por los expertos en la materia, y preferiblemente células huésped capaces de expresar anticuerpos. Los vectores incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, cósmidos, bacmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y baculovirus, así como otros vectores bacterianos, eucarióticos, de levadura y virales. Las células huésped adecuadas incluyen, sin limitación, células CHO, células NS0, células HEK293 o cualquier línea celular eucariota estable conocida o producida, y también incluyen bacterias, levaduras y células de insectos.
- 30 **[0096]** Los anticuerpos también pueden ser producidos por células de hibridoma; los métodos para producir hibridomas son bien conocidos y establecidos en la técnica.
- 35 **[0097]** La divulgación también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos anti-IL-15. Las composiciones pueden comprender cualquiera de los anticuerpos descritos y/o ejemplificados en el presente documento y un portador aceptable, como un portador farmacéuticamente aceptable. Entre los soportes adecuados se incluye cualquier medio que no interfiera con la actividad biológica del anticuerpo y, preferiblemente, que no sea tóxico para el huésped al que se administre. El portador puede ser una solución acuosa. Las composiciones pueden comprender cualquiera de los anticuerpos descritos y/o ejemplificados aquí y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 **[0098]** Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse para tratar una enfermedad autoinmune, incluida una enfermedad autoinmune en la que la IL-15 está desregulada. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse para tratar una enfermedad inflamatoria, incluida una enfermedad inflamatoria en la que la IL-15 está desregulada. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse para tratar un trastorno inflamatorio, incluido un trastorno inflamatorio en el que la IL-15 está desregulada. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-IL-15 pueden usarse para tratar la enfermedad celíaca, la enfermedad celíaca refractaria, la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes de tipo 1, la alopecia areata, así como cierto tipo de cáncer, como la leucemia linfocítica granular de células T en un sujeto. Así, la divulgación presenta métodos de tratamiento.
- 45 **[0099]** En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad autoinmune en la que la IL-15 está desregulada, de tal manera que se trata la enfermedad autoinmune en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferiblemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la enfermedad autoinmune en la que la IL-15 está desregulada en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.
- 50 **[0100]** En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad inflamatoria en la que la IL-15 está desregulada, de manera que se trata la enfermedad inflamatoria en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad inflamatoria en la que la IL-15 está desregulada en el
- 55

sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0101] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para un trastorno inflamatorio en el que la IL-15 está desregulada, de manera que se trata el trastorno inflamatorio en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferiblemente en una cantidad que sea eficaz para tratar el trastorno inflamatorio en el que la IL-15 está desregulada en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0102] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la enfermedad celíaca, de tal manera que se trata la enfermedad celíaca en el sujeto, y la enfermedad celíaca puede ser refractaria. La enfermedad celíaca refractaria (RCD) afecta a pacientes que no se han curado y presentan síntomas continuos de enfermedad celíaca, tras 6-12 meses de dieta estricta sin gluten y cuando se han descartado otras causas de los síntomas (incluida la malignidad). También puede ocurrir en pacientes que previamente respondieron a una dieta sin gluten a largo plazo, pero que ahora muestran síntomas de enfermedad celíaca, mientras mantienen una dieta estricta sin gluten (Rishi et al. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology:10 537-546 (2016)). Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la enfermedad celíaca en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0103] Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse para tratar o inhibir uno o más síntomas de exposición al gluten, por ejemplo, causados por la ingestión de gluten. Uno o más síntomas incluyen dolor muscular, dolor corporal, dolor articular, fatiga, hinchazón, gases, náuseas, calambres, estreñimiento, diarrea, erupción cutánea, dolor de cabeza, migraña, depresión, ansiedad, niebla cerebral e irritabilidad. En general, los métodos comprenden la administración de un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto con sensibilidad al gluten que ha estado expuesto al gluten, de forma que se inhiben o tratan uno o más síntomas de la exposición al gluten en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar o inhibir uno o más síntomas de la exposición al gluten en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0104] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la artritis reumatoide, de tal manera que se trata la artritis reumatoide en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la artritis reumatoide en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0105] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la psoriasis, de tal manera que se trata la psoriasis en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferiblemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la psoriasis en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0106] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la enfermedad inflamatoria intestinal, de tal manera que se trata la enfermedad inflamatoria intestinal en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0107] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la diabetes de tipo 1, de tal manera que se trata la diabetes de tipo 1 en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad eficaz para tratar la diabetes de tipo 1 en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0108] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la alopecia areata, de tal manera que se trata la alopecia areata en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la alopecia areata en el sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0109] En algunos aspectos, los métodos de tratamiento comprenden administrar un anticuerpo anti-IL-15, o una composición del mismo, a un sujeto que necesita tratamiento para la leucemia linfocítica granular grande de células T, de tal manera que se trata la leucemia linfocítica granular grande de células T en el sujeto. Los anticuerpos anti-IL-15 se administran preferentemente en una cantidad que sea eficaz para tratar la leucemia linfocítica granular de células T en el

sujeto. La cantidad efectiva puede variar, por ejemplo, según las necesidades o el estado del sujeto. La administración puede realizarse bajo la dirección o el control de un médico.

[0110] Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad celíaca. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca refractaria. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la alopecia areata. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfocítica granular de células T. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en la fabricación o preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento o inhibición de uno o más síntomas de la exposición al gluten, por ejemplo, la exposición al gluten en un paciente que tiene una sensibilidad o alergia al gluten. Uno o más síntomas pueden incluir dolor muscular, dolor corporal, dolor articular, fatiga, hinchazón, gases, náuseas, calambres, estreñimiento, diarrea, erupción cutánea, dolor de cabeza, migraña, depresión, ansiedad, niebla cerebral y/o irritabilidad.

[0111] Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la enfermedad celíaca. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la enfermedad celíaca refractaria. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la artritis reumatoide. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la psoriasis. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la diabetes de tipo 1. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la alopecia areata. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse en el tratamiento de la leucemia linfocítica granular de células T. Los anticuerpos anti-IL-15 pueden utilizarse para el tratamiento o la inhibición de uno o más síntomas de la exposición al gluten, por ejemplo, la exposición al gluten en un paciente con sensibilidad o alergia al gluten. Uno o más síntomas pueden incluir dolor muscular, dolor corporal, dolor articular, fatiga, hinchazón, gases, náuseas, calambres, estreñimiento, diarrea, erupción cutánea, dolor de cabeza, migraña, depresión, ansiedad, niebla cerebral y/o irritabilidad.

[0112] La divulgación también presenta kits que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-IL-15, y estos kits pueden utilizarse para suministrar anticuerpos y otros agentes para su uso en métodos de diagnóstico, investigación básica o terapéuticos, entre otros. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo en un método para tratar la enfermedad celíaca. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo en un método para tratar la enfermedad celíaca refractaria. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para utilizar el anticuerpo en un método para tratar o inhibir uno o más síntomas de la exposición al gluten, por ejemplo, en un paciente con una sensibilidad o alergia al gluten. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo en un método para tratar la artritis reumatoide. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo en un método para tratar la psoriasis. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para utilizar el anticuerpo en un método para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para utilizar el anticuerpo en un método para tratar la diabetes de tipo 1. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para utilizar el anticuerpo en un método para tratar la alopecia areata. En algunos aspectos, los kits comprenden cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento e instrucciones para usar el anticuerpo en un método para tratar la leucemia linfocítica granular de células T.

[0113] También se proporcionan métodos para detectar IL-15 en una muestra de tejido aislada de un sujeto. En general, dichos métodos comprenden poner en contacto cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento con una muestra de tejido aislada de un sujeto para formar un complejo anticuerpo-IL-15 con el Receptor-alfa de IL-15, y detectar el complejo en la muestra de tejido. El método puede comprender además el aislamiento de la muestra de tejido del sujeto. La muestra de tejido puede ser de tejido gastrointestinal, incluyendo tejido esofágico, tejido estomacal, tejido del intestino delgado, tejido del intestino grueso y otro tejido del tracto gastrointestinal. El anticuerpo puede conjugarse con una marcación detectable. El anticuerpo puede detectarse con un anticuerpo secundario marcado con una marcación detectable. Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro* o *in situ*.

[0114] También se proporcionan métodos para detectar un complejo de IL-15 y Receptor-alfa de IL-15 en una muestra de tejido aislada de un sujeto. En general, dichos métodos comprenden poner en contacto cualquier anticuerpo anti-IL-15 descrito o ejemplificado en el presente documento con una muestra de tejido aislada de un sujeto para formar un complejo anticuerpo-antígeno del anticuerpo anti-IL-15 unido a un complejo de IL-15 y Receptor-alfa de IL-15, y detectar el complejo

anticuerpo-antígeno en la muestra de tejido. El método puede comprender además el aislamiento de la muestra de tejido del sujeto. La muestra de tejido puede ser de tejido gastrointestinal, incluyendo tejido esofágico, tejido estomacal, tejido del intestino delgado, tejido del intestino grueso y otro tejido del tracto gastrointestinal. El anticuerpo puede conjugarse con una marcación detectable. El anticuerpo puede detectarse con un anticuerpo secundario marcado con una marcación detectable. Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro* o *in situ*.

[0115] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la divulgación con mayor detalle. Pretenden ilustrar, no limitar, la divulgación. En los ejemplos, la referencia a una posición de un residuo es una referencia a la posición en la secuencia pertinente tal como se establece en el presente documento, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

Generación de ratas transgénicas, inmunización y producción de hibridomas

1.1 Proteína IL-15 y proteína IL-15R α

[0116] La interleucina 15 humana (IL-15) se adquirió (Sigma) o se produjo en un sistema de expresión HEK293F de mamífero, utilizando plásmidos que codifican la IL-15 humana y el receptor soluble de IL-15 α (IL-15R α) con una marcación HIS y AVI situada N-terminalmente (SEQ ID N.º: 512) en una relación de 1:1.

1.2 Generación de ratas transgénicas

[0117] Las ratas transgénicas se generaron como se describe en Publicación PCT n.º WO 08/151081. En resumen, se integró un constructo de expresión de meganucleasas en el genoma de un animal sujeto. La expresión de la meganucleasa en células germinales provocó roturas de doble cadena en genes endógenos de inmunoglobulina de rata. El apareamiento de estas ratas transgénicas dio lugar a crías con genes de inmunoglobulina de rata endógena mutados/inactivados.

[0118] Las ratas transgénicas se modifican además para portar genes artificiales de inmunoglobulina humana, de manera que las ratas sean capaces de producir anticuerpos con regiones variables totalmente humanas.

1.3 Inmunizaciones

[0119] Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra el complejo de IL-15 con el Receptor-alfa de IL-15, se inmunizaron ratas transgénicas (generadas como se describió anteriormente) con ADN que codifica IL-15 humana con y ADN que codifica IL-15R α humana.

[0120] Se inmunizaron diez animales y se monitorizó la respuesta inmunitaria a lo largo de la inmunización con muestras de plasma obtenidas por hemorragias submandibulares. Se analizó la expresión de anticuerpos en el plasma mediante ELISA y se seleccionaron los animales con títulos suficientes de anticuerpos anti-IL-15 para la fusión y la generación de hibridomas. Los animales con un título elevado fueron reforzados por vía subcutánea con el complejo IL-15 humano recombinante 5 días antes del sacrificio.

1.4 Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra el complejo IL-15

[0121] Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales contra el complejo IL-15 con el Receptor alfa de IL-15, se aislaron esplenocitos y células de ganglios linfáticos de animales inmunizados y se fusionaron con una línea celular inmortalizada. Se fusionaron suspensiones unicelulares de linfocitos con células de mieloma de ratón no secretoras P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580). Las células se sembraron a aproximadamente 1×10^5 células/mL en placas de microtitulación de fondo plano, seguidas de 2 semanas de incubación en medio selectivo que contenía, además de los reactivos habituales, 10% de suero clonado fetal y 1x HAT (Sigma). A continuación, se analizaron pocillos individuales mediante ELISA y BIACORE® en busca de anticuerpos IgG IL-15 humanos de alta afinidad.

Ejemplo 2

Cribado de hibridomas

2.1 Uso de ELISA para seleccionar anticuerpos que se unen al complejo IL-15 pero no se unen al receptor α de IL-15 no complejoado.

[0122] Se recubrieron placas de microtitulación con IL-15 purificada o IL-15R α purificada o complejo IL-15 purificado. Brevemente, las placas de microtitulación se recubrieron con proteína purificada en PBS y luego se bloquearon con proteínas irrelevantes como la albúmina sérica bovina (BSA) diluida en PBS. Se añadieron diluciones de sobrenadantes de hibridoma a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a 37° C. Las placas se lavaron con PBS/TWEEN® 20 y, a continuación, se incubaron con un reactivo policlonal de cabra-anti-IgG humana específica de Fc conjugado con un reactivo de detección adecuado (*p. ej.*, peroxidasa de rábano picante) fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37° C. Tras el

lavado, las placas se revelaron con un sustrato adecuado (*p. ej.*, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina TMD) y se analizaron a una OD de 405. Los hibridomas que produjeron anticuerpos que mostraron reactividad positiva con el complejo IL-15 pero no con IL-15R α se seleccionaron para su caracterización posterior.

5 **2.2 Uso de ELISA celular (cELISA) para seleccionar anticuerpos que se unen al complejo IL-15 pero no se unen al receptor α de IL-15 no complejado.**

10 **[0123]** Cada uno de los hibridomas probados como arriba también se probaron en un ensayo inmunoenzimático basado en células (cELISA) para seleccionar anticuerpos que se unen al complejo IL-15 pero no se unen a IL-15R α no complejado.

15 **[0124]** cELISA se llevó a cabo de la siguiente manera. Se transfectaron células HEK con ADN que codificaba IL-15 e IL-15R α de forma que expresaran el complejo IL-15. Las células HEK transfectadas se recubrieron en una placa ELISA y se aplicaron diluciones de sobrenadantes de hibridoma a la placa para que pudiera unirse al complejo IL-15 expresado en la superficie de las células. El ensayo se repitió utilizando células HEK transfectadas con IL-15R α de forma que expresaran IL-15R α no multiplexada. La ventaja de utilizar cELISA además de ELISA clásico es que se utiliza un complejo proteico nativo para cribar los anticuerpos.

20 **[0125]** Como control positivo, se analizó la expresión en la superficie celular del complejo IL-15 o IL-15R α no complejado utilizando un anticuerpo IL-15-ficoeritrina (PE) antihumano (R&D Systems, Cat. N.º IC2471P). Los hibridomas que producían anticuerpos que mostraban reactividad positiva con el complejo IL-15 pero no con IL-15R α se seleccionaron para su caracterización ulterior.

25 **[0126]** En la Figura 1 se muestra una selección representativa de los resultados. El anticuerpo 4 se unió a la IL-15 no compleja y al complejo IL-15, pero no a la IL15R α no compleja. El anticuerpo 1A6 no se unió a la IL-15 no compleja, al complejo IL-15 o a la IL-15R α , y no se seleccionó para su caracterización posterior. El anticuerpo 1B3 se unió a la IL-15 no compleja, al complejo IL-15 y a la IL-15R α . La unión a IL-15R α no complejada es desventajosa porque indica que los clones no son específicos de IL-15.

30 **Ejemplo 3**

Identificación de anticuerpos candidatos para su posterior desarrollo

3.1 Ensayo basado en células CTLL-2

35 **[0127]** Se probaron 1500 muestras de hibridoma que se unían al complejo IL-15 pero no a IL-15 α en un ensayo basado en células CTLL-2 murinas para determinar cuáles neutralizaban la actividad biológica de IL-15. La línea celular CTLL-2 se deriva del linfoma citotóxico de células T (ATCC: TIB-214) y responde tanto a la IL-2 como a la IL-15.

40 **[0128]** Se probó la capacidad de los sobrenadantes de hibridoma (anticuerpos no purificados) para neutralizar la proliferación inducida por IL-15 de las células CTLL-2.

45 **[0129]** Las células CTLL-2 se incubaron en medios completos sin IL-2 ni IL-15 durante 4 horas antes de la prueba. Las células CTLL-2 (5×10^4 /pocillo) se incubaron en placas de 96 pocillos con el complejo IL-15 con el Receptor alfa de IL-15 a 200 pM para inducir la proliferación celular. Los sobrenadantes de hibridoma se añadieron a las placas y se incubaron durante 48 horas. A continuación, se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y se leyó en el luminómetro de microplacas GLOMAX® 96 (Promega). Datos no mostrados.

3.2 Ensayos BIACORE®

50 **[0130]** Paralelamente a los ensayos basados en células descritos anteriormente, los 1500 hibridomas también se probaron para la actividad de unión al complejo IL-15 y se midió su afinidad. Se utilizó un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR). El cribado SPR se llevó a cabo utilizando un Biosensor BIACORE® 4000 (GE Healthcare) en un ensayo de paso de analito de concentración única. CM5 Series S (GE Healthcare) se acopló a la máquina. Se utilizó la solución de normalización Bia (GE Healthcare). El direccionamiento hidrodinámico se realizó en el chip acoplado y superó el control de calidad interno.

60 **[0131]** Se inmovilizó un anticuerpo anti fragmento Fc de rata (Bethyl A110-136A) en la superficie de un chip sensor CM5 utilizando un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó en acetato de sodio pH 4,5 hasta una concentración de 50 μ g/mL para su inmovilización y se inmovilizó en los Spots 1, 2, 4, 5 de las celdas de flujo 1-4 utilizando el tampón HBS-EP+ (GE Healthcare) y un tiempo de acoplamiento de 10 minutos. Todas las interacciones se midieron a 25 °C. El resultado fue un nivel de inmovilización de entre 10.000 y 12.000 unidades de respuesta para cada punto en las cuatro celdas de flujo. Las células se regeneraron utilizando un tampón de ácido fosfórico 100 mM.

65 **[0132]** Para la evaluación de la unión del hibridoma, se añadieron 70 μ l de tampón de funcionamiento HBS-EP+ a 50 μ l de sobrenadante de hibridoma de rata. Se utilizó el método siguiente:

Arranque - Regeneración 3 ciclos 10 segs cada uno a 30 μ L /min
Recorrido de muestra:

[0133]

5

Captura - Punto 1 - Celdas de flujo 1-4 - Inyección de 130 segundos - 30 μ L/min - inyección normal - En este paso se cargan 4 muestras diferentes en el punto 1 desde cada una de las cuatro celdas de flujo. Captura - Punto 5 - Celdas de flujo 1-4 - Inyección de 130 segundos - 30 μ L/min - inyección normal - En este paso se cargan 4 muestras diferentes en el punto 5 desde cada una de las cuatro celdas de flujo. Muestra - Todos los puntos, todas las celdas de flujo - Inyección de 60 segundos, 60 segundos de disociación - 30 μ L/min - inyección normal - El complejo humano de IL-15 (20 μ g/mL; lote 491p90A) se inyecta sobre todas las celdas de flujo y todos los puntos.

10

Regeneración 1 - 20 seg 100 mM ácido fosfórico

Regeneración 2 - 15 seg 100 mM ácido fosfórico

15

Regeneración 3 - 10 seg 100 mM ácido fosfórico

Entre cada placa de 96 pocillos se realizó otro ciclo de regeneración -según el ciclo de inicio-.

Análisis

20

[0134] Para el análisis se utilizó el software BiaEvaluation, captura con cinética. Se analizaron los sensorgramas de 5-4 y 1-2. Esto permitió sustraer la señal del complejo IL-15 de una mancha que no contenía anticuerpo. La mancha 3 no se utilizó en el análisis. A continuación, se analizó cada sensorgrama y se rechazaron las muestras que no mostraban unión del anticuerpo al complejo y se aprobaron las que mostraban unión del complejo IL-15 con el receptor alfa de IL-15. Se realizó el ajuste de curvas y se obtuvo una tabla de las medidas de afinidad.

25

3.3 Secuenciación de regiones variables

[0135] La identidad molecular de las regiones variables de anticuerpos en los gránulos de hibridoma no clonal seleccionados se estableció por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa.

30

[0136] Brevemente, se descongelaron placas de 96 pocillos que contenían pellets de hibridoma tras su crioconservación a -80°C en RNALATER® (Thermo). Las placas se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos para granular las células y se eliminó el tampón RNALATER®. El ARN se aisló de las placas de hibridomas utilizando un kit de purificación de ARN total GENELUTE™ de 96 pocillos (Sigma #RTN9602, RTN9604) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración y la calidad de las muestras de ARN resultantes se determinaron con un espectrofotómetro NANODROP® 8000 (Thermo). El ARN se transcribió inversamente en ADNc utilizando un cebador oligo(dT) y la transcriptasa inversa AccuScript (Agilent #600184). La reacción de síntesis del ADNc se montó según el protocolo del fabricante y la síntesis del ADNc se llevó a cabo a 42 °C durante 30 minutos.

35

40

[0137] La amplificación de las regiones variables de anticuerpos humanos de los hibridomas transgénicos derivados de roedores se realizó por PCR utilizando PfuUltrall (Agilent) o polimerasas de ADN de alta fidelidad Q5 (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cadenas pesadas se amplificaron utilizando pares de cebadores específicos para la secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada de roedores y las secuencias de ADN de las secuencias líderes de la cadena pesada humana. Las regiones variables de la cadena ligera lambda se amplificaron de forma similar utilizando pares de cebadores específicos para la secuencia de ADN de la región constante lambda humana y las secuencias de ADN de las secuencias líderes de la cadena lambda humana.

45

[0138] La amplificación exitosa de las regiones variables se confirmó corriendo una pequeña alícuota de la reacción PCR en un gel usando un sistema de electroforesis e-gel (Thermo). La limpieza posterior a la PCR de las reacciones se realizó utilizando un sistema de limpieza de PCR GENELUTE™ de 96 pocillos (Sigma #PCR9604) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración del ADN purificado resultante se evaluó con un espectrofotómetro Nanodrop. La secuenciación Sanger de los fragmentos PCR se realizó utilizando oligos diseñados para unirse internamente a los amplicones de cadena pesada o ligera. Las secuencias de ADN resultantes se tradujeron conceptualmente en secuencias de aminoácidos para su posterior análisis antes de su uso en la generación de cadenas de anticuerpos de longitud completa. Se seleccionaron regiones variables de anticuerpos con secuencias de aminoácidos únicas (con al menos un cambio de aminoácido en la secuencia completa) para convertirlas en anticuerpos humanos de longitud completa.

50

55

3.4 Generación de plásmidos para la producción de anticuerpos

[0139] Las secuencias de región variable se retrotradujeron a secuencias de ADN utilizando la tecnología GENEOPTIMIZER® antes de sintetizar el ADN resultante *de novo* mediante ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos (GeneArt, Alemania). Las secuencias sintetizadas de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos que contenían una región constante de cadena pesada IgG1 humana (como el número de acceso Swissprot P01857) o una región constante lambda humana (número de acceso Swissprot P0CG05) para producir cadenas de anticuerpos de longitud completa.

60

65

3.5 Expresión de anticuerpos

[0140] Los anticuerpos se produjeron mediante la cotransfección de plásmidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo en células EXP1293[®] (Life Technologies). El día anterior a la transfección, se determinó el número de células necesarias para el experimento. Para cada transfección de 20 mL, se necesitaron $3,6 \times 10^7$ células en 20 mL de medio de expresión EXP1293[®]. El día anterior a la transfección, las células se sembraron en tubos biorreactores TPP de 50 mL a una densidad de $0,9 \times 10^6$ células viables/mL y se incubaron durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 8% en aire en un agitador orbital que giraba a 200 rpm. El día de la transfección, se determinó el número de células y su viabilidad utilizando un contador celular automatizado. Sólo se utilizaron cultivos con >98% de células viables. Para cada transfección de 20 mL, se prepararon complejos lípido-ADN diluyendo 10 µg de ADN de cadena pesada y 10 µg de ADN de cadena ligera en OPTI-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Cat. no. 31985-062) hasta un volumen total de 1,0 mL. Se diluyeron 54 µL de reactivo EXPIFECTAMINE[®] 293 en medio OPTI-MEM[®] I hasta un volumen total de 1,0 mL. Ambos viales se mezclaron suavemente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, el ADN diluido se mezcló con el reactivo EXPIFECTAMINE[®] 293 diluido y la mezcla DNA-EXPIFECTAMINE[®] 293 se incubó otros 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos DNA-EXPIFECTAMINE[®] 293 Reactivo. Tras la incubación, se añadieron 2 mL de complejo de reactivo DNA-EXPIFECTAMINE[®] 293 a cada tubo biorreactor TPP de 50 mL. Al tubo de control negativo se añadieron 2 mL de medio OPTI-MEM[®] I en lugar del complejo de reactivos DNA-EXPIFECTAMINE[®] 293. Las células se incubaron en un incubador a 37°C con una atmósfera humidificada de 8% de CO₂ en aire en un agitador orbital que giraba a 200 rpm. Aproximadamente 16-18 horas después de la transfección, se añadieron a cada tubo 100 µL de Potenciador de Transfección 1 EXPIFECTAMINE[®] 293 y 1,0 mL de Potenciador de Transfección 2 EXPIFECTAMINE[®] 293. Los anticuerpos se recogieron aproximadamente 72 horas después de la transfección.

3.6 Purificación de anticuerpos

[0141] Los cultivos de células EXP1293[®] transfectadas se centrifugaron en tubos falcon de 50 mL a 3000 x g durante 20 minutos, y los sobrenadantes se filtraron utilizando un filtro de 0,22 µm (Corning). Los sobrenadantes que contenían anticuerpos se purificaron utilizando un robot Gilson ASPEC GX274 mediante cromatografía de proteína A. Brevemente, los cartuchos SPE (Agilent, 12131014) empaquetados con 1,2 mL de resina de proteína A MABSELECT SURE[®] (GE Healthcare) se preequilibraron con 3 volúmenes de columna de 1X PBS. Se pasaron 18 mL de sobrenadante por las columnas, seguidos de un lavado con 4 mL de PBS 1X. Cada columna se eluyó previamente con 0,9 mL de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,9. Los anticuerpos purificados se eluyeron con 2 mL de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,9. Los anticuerpos se desalaron en Sørensen PBS (59,5 mM KH₂PO₄, 7,3 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 145,4 mM NaCl (pH ~5.8)) utilizando columnas PD-10 (GE Healthcare).

3.7 Dilución en tres puntos en células CTLL-2

[0142] Se probó la capacidad de cada anticuerpo purificado en tres diluciones diferentes para inhibir la proliferación mediada por IL-15 de células CTLL2.

[0143] Las células CTLL-2 se incubaron en medios completos sin IL-2 ni IL-15 durante 4 horas antes de la prueba. Las células (5×10^4 /pocillo) se incubaron en placas de 96 pocillos con 200 pM de complejo de IL-15 con el receptor alfa de IL-15, la concentración que inducía el 50% de la proliferación celular máxima (EC₅₀). Se añadieron diluciones de anticuerpos a las placas y se incubaron durante 48 horas. Se utilizaron tres diluciones del anticuerpo anti-IL-15: 2000 pM, 200 pM y 20 pM. A continuación, se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO[®] (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y se leyó en un luminómetro de microplacas GLOMAX[®] 96 (Promega). Los datos se expresaron como unidades relativas de luminiscencia (el número de células viables en cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas).

[0144] Esta respuesta de dosis cruda de la capacidad de los anticuerpos para neutralizar funcionalmente la actividad biológica de IL-15 se utilizó para seleccionar anticuerpos para análisis posteriores. En la Figura 2A se muestra una selección representativa de los resultados. El anticuerpo 4 fue un antagonista muy potente de la actividad de la IL-15.

3.8 Respuesta de dosis completa en células CTLL-2

[0145] Los anticuerpos seleccionados se ejecutaron en una versión de 10 puntos del ensayo celular CTLL-2 anterior con el objetivo de generar curvas dosis-respuesta completas.

[0146] En la Figura 2B se muestra una selección representativa de los resultados. El perfil de inhibición relativa de cada anticuerpo se evaluó utilizando el valor IC₅₀ (la concentración de anticuerpos anti-IL-15 a la que la proliferación celular se reduce a la mitad). De los anticuerpos probados, los más potentes fueron el anticuerpo 4 y el anticuerpo 10F.

3.9 Respuesta de dosis completa en células NK-92

[0147] Los anticuerpos más potentes en el ensayo celular CTLL-2 se sometieron a otro ensayo celular utilizando células NK-92. La línea celular se deriva del linfoma no Hodgkin maligno NK (ATCC: CRL-2407).

[0148] Las células NK-92 se incubaron en medios completos sin IL-2 o IL-15 durante 4 horas antes de la prueba. Se incubaron células (5×10^4 /pocillo) en placas de 96 pocillos con IL-15 complejada con el receptor alfa de IL-15 a 25 pM (EC_{50}) para inducir la proliferación celular. Se añadieron dosis de anticuerpos a las placas y se incubaron durante 48 horas. A continuación, se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO® (Promega) según las instrucciones del fabricante y se leyó en el luminómetro de microplacas GLOMAX® 96 (Promega) como se ha descrito anteriormente. Los datos se expresaron como unidades de luminiscencia relativa.

[0149] En la Figura 3 se muestra una selección representativa de los resultados. El perfil de inhibición relativa de cada anticuerpo se evaluó utilizando el valor IC_{50} . El anticuerpo 4 presentó el valor IC_{50} inhibitorio más bajo (0,1 nM) y se identificó como el inhibidor más potente de la proliferación celular impulsada por IL-15.

Ejemplo 4

Modificación del anticuerpo

[0150] El anticuerpo 4 fue alterado con el objetivo de producir un efecto positivo en las propiedades biofísicas del anticuerpo, así como mejorar la potencia.

4.1 Localización de los aminoácidos críticos para la unión

[0151] Se generaron variantes del anticuerpo original modificando cada residuo en las secuencias CDR y evaluando el efecto sobre la potencia del anticuerpo y las propiedades de unión (exploración CDR). Se generaron nueve variantes en cada posición CDR modificando los residuos a alanina (A), ácido aspártico (D), histidina (H), lisina (K), leucina (L), glutamina (Q), serina (S), triptófano (W) o tirosina (Y). Estos nueve aminoácidos se eligieron debido a su gama de propiedades, de modo que se probaron todas las propiedades funcionales, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades funcionales de los aminoácidos

Aminoácido	Propiedad funcional
Alanina (A)	Tamaño pequeño
Ácido aspártico (D)	Ácida
Histidina (H)	Básica; estructura del anillo
Lisina (K)	Básica
Leucina (L)	Hidrofóbica
Glutamina (Q)	Ámida
Serina (S)	nucleofílico
Triptófano (W)	Aromático
Tirosina (Y)	Aromático

[0152] Esto resultó en la selección de ~520 variantes del Anticuerpo 4, cada una difiriendo del Anticuerpo 4 en 1 aminoácido. Los anticuerpos se generaron como se ha descrito anteriormente y el cribado se realizó mediante resonancia de plasmón superficial en un sistema Biacore T200 (GE Healthcare) utilizando un chip CM5 Protein A (GE Healthcare). El tampón utilizado fue HBS-EP+ (GE Healthcare), todas las interacciones se midieron a 25 °C y la frecuencia de recogida de datos se fijó en 10 Hz. Antes de ejecutar el método, se realizó un ciclo de arranque en el que ambas celdas de flujo del chip se limpiaron con dos pulsos consecutivos de 60 s de ácido cítrico 0,1 M (pH 3,0).

[0153] Los sobrenadantes de células F EXPI293® coexpresantes de variantes de anticuerpos se diluyeron 1 en 100 en HBS-EP+ (GE Healthcare) y el complejo IL-15 humano se diluyó a 10 µg/mL en el mismo tampón. Los anticuerpos se capturaron en la segunda celda de flujo del chip y la unión se midió mediante la inyección de 30 µl de complejo IL-15 humano a una velocidad de flujo de 30 µl/min a través de ambas celdas de flujo y permitiendo 120 s de tiempo de disociación. La superficie del chip se regeneró entre ciclos con dos pulsos consecutivos de 60 s de ácido cítrico 0,1 M (pH 3,0) sobre ambas celdas de flujo.

[0154] Los datos de FC2-1 se utilizaron para el análisis. Los sensorgramas resultantes se analizaron creando dos puntos de informe personalizados, cada uno calculado para una ventana de 1 s que comenzaba 5 s después de la inyección de la muestra ("unión temprana") o 5 s antes del final de la disociación ("unión tardía"). Los anticuerpos se clasificaron en función de la relación de estos dos puntos de notificación ("unión tardía"/"unión temprana") como estimación de la tasa de disociación. Los niveles relativos de captura se utilizaron como indicador aproximado de la productividad. Los resultados de los experimentos de modificación de CDR se muestran en las figuras 5-34. Las Figuras 5-33 muestran modificaciones

únicas que condujeron a un anticuerpo mejorado (sombreado gris) y la Figura 34 resume las modificaciones únicas y múltiples probadas que condujeron a un anticuerpo mejorado.

[0155] Estos experimentos identificaron los aminoácidos que eran críticos para la unión y la potencia, así como los aminoácidos que podían sustituirse sin cambios en la unión o la potencia. Sorprendentemente, se descubrió que la sustitución de aminoácidos en la posición 54 o 56 en la CDR2 de la cadena pesada por aminoácidos aromáticos Y o W conducía a un aumento de la potencia del anticuerpo.

[0156] Se hicieron otras variantes para probar la sustitución de aminoácidos en la posición 54 o 56 en CDR2 de la cadena pesada por el aminoácido aromático fenilalanina (F). Estas dos variantes también mostraron un aumento de potencia en el ensayo de proliferación de células NK-92.

[0157] Se generaron variantes dobles en las que ambos aminoácidos en la posición 54 o 56 de la CDR2 de la cadena pesada se modificaron a Y, W o F. La potencia de las variantes dobles se evaluó en el ensayo de proliferación de células NK-92 como se describe en la sección 3.9. Los resultados figuran en la Tabla 2.

Tabla 2. 54-56 variantes dobles.

		Posición 54		
		F	Y	W
Posición 56	F	4.9 pM	6.6 pM	3.4 pM
	Y	11.2 pM	7.4 pM	10.1 pM
	W	8.3 pM	7.6 pM	5.1 pM

[0158] Se descubrió que el efecto de incluir dos aminoácidos aromáticos en las posiciones 54 y 56, en lugar de ser contraactivo, conducía a una mejora acumulativa de la potencia.

[0159] El anticuerpo 11 (que comprende 54Y y 56Y) tiene al menos una mejora de 10 veces de IC₅₀ en el ensayo de proliferación de células NK-92 en comparación con el anticuerpo 4 (Figura 35 y Tabla 3).

4.2 Modificación del anticuerpo 4 para reducir epítopos inmunogénicos potenciales

[0160] Para eliminar epítopos potencialmente inmunogénicos en anticuerpos, se pueden realizar sustituciones en la secuencia peptídica para revertir la secuencia en esta región a la secuencia de anticuerpos de la línea germinal. La sustitución de 182aS en la cadena pesada (anticuerpo 63) dio lugar a una secuencia de línea germinal y eliminó el péptido inmunogénico previsto en esta región. Esta sustitución no tuvo ningún impacto en la potencia en el ensayo NK-92, como se muestra en la Tabla 3 (Anticuerpo 63 comparado con Anticuerpo 11).

[0161] La sustitución de N30S en la cadena ligera (anticuerpo 73) dio lugar a una secuencia de línea germinal y eliminó el péptido inmunogénico previsto en esta región. Esta sustitución tuvo un impacto menor en la potencia en el ensayo NK-92, como se muestra en la Tabla 3 (Anticuerpo 73 comparado con Anticuerpo 11).

[0162] Cuando ambas sustituciones se combinaron en un anticuerpo, el anticuerpo 64, se observó una ligera reducción de la potencia en comparación con el anticuerpo 11 (Figura 35).

Tabla 3. Lista de variantes de inmunogenicidad reducida.

Anticuerpo #	Sustituciones de cadena pesada	Sustituciones de cadena ligera	IC 50 (NK-92) en pM	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	Longitud completa SEQ ID NO:
Anticuerpo 4	De tipo salvaje	WT	148	7	8	9
Anticuerpo 11	S54Y + N56Y	WT	8.3	454	8	9
Anticuerpo 63	S54Y + N56Y + I82aS	WT	4.21075	4	8	
Anticuerpo 64	S54Y + N56Y + I82aS	N30S	13.5975	4	455	456
Anticuerpo 65	S54Y + N56Y + I82aS	D92E	42.48	4	503	
Anticuerpo 66	S54Y + N56Y + I82aS	S93L	6.0443	4	457	458
Anticuerpo 67	S54Y + N56Y + I82aS	S93F	7.688	4	505	
Anticuerpo 68	S54Y + N56Y + I82aS	S93F	5.338	4	459	460
Anticuerpo 69	S54Y + N56Y + I82aS	N30S-D92E	182.5	4	507	
Anticuerpo 70a	S54Y + N56Y + I82aS	N30S-S93L	18.178	4	5	6
Anticuerpo 71	S54Y + N56Y + I82aS	N30S-S93E	26.39	4	509	
Anticuerpo 72	S54Y + N56Y + I82aS	N30S-S93F	20.93	4	510	
Anticuerpo 73	S54Y + N56Y	N30S	11.842	454	455	
Anticuerpo 74	S54Y + N56Y	D92E	33.9	454	503	
Anticuerpo 75	S54Y + N56Y	S93L	2.136	454	457	
Anticuerpo 76	S54Y + N56Y	S93E	7.686	454	505	
Anticuerpo 77	S54Y + N56Y	S93F	6.694	454	506	
Anticuerpo 78	S54Y + N56Y	N30S-D92E	168	454	507	
Anticuerpo 79	S54Y + N56Y	N30S-S93L	12.38	454	5	
Anticuerpo 80	S54Y + N56Y	N30S-S93E	22.75	454	509	
Anticuerpo 81	S54Y + N56Y	N30S-S93F	17.29	454	510	

4.3 Modificación del anticuerpo 64 para mejorar su fabricación

[0163] El análisis de aminoácidos de la secuencia variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo 64 y anticuerpos relacionados identificó aminoácidos que pueden sufrir isomerización. Los cambios en estos aminoácidos pueden, con el tiempo, alterar la estabilidad del anticuerpo. En la cadena ligera, D92 y S93, fueron identificados como un sitio potencial de isomerización del ácido aspártico. Para reducir el impacto potencial de estos problemas previstos, se produjeron variantes del anticuerpo 64 que contenían sustituciones de aminoácidos conservadoras o semiconservadoras en estas posiciones. Estas sustituciones y su impacto en la potencia de las variantes resultantes se enumeran en la Tabla 4. La Figura 35 muestra una selección representativa de las variantes probadas en el ensayo de proliferación de células NK-92.

[0164] Las modificaciones para mejorar la fabricabilidad cambiando D92 conducen a una pérdida de potencia (véase el Anticuerpo 68 comparado con el Anticuerpo 11) La alteración de S93 a L93 sorprendentemente resultó en una mejora de la potencia del anticuerpo, como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 35.

[0165] En la Tabla 4 se presenta un resumen de las modificaciones realizadas en el anticuerpo 4 para generar el anticuerpo 70. [0008] Posición del aminoácido Residuo no modificado (Anticuerpo 4) Residuo modificado (Anticuerpo 70) Propiedad mejorada H54 S S Potencia mejorada H56 N S Potencia mejorada H82a I S Elimina epítipo inmunogénico

potencial por germlining L30 N S Elimina epítipo inmunogénico potencial por germlining L93 S L Reduce sitio de isomerización potencial

Tabla 4. Resumen de la modificación

Posición de aminoácidos	Residuo no modificado (Anticuerpo 4)	Residuo modificado (Anticuerpo 70)	Propiedad mejorada
H54	S	Y	Potencia mejorada
H56	N	Y	Potencia mejorada
H82a	I	S	Retira el epítipo potencialmente inmunogénico por modificación de la línea germinal
L30	N	S	Retira el epítipo potencialmente inmunogénico por modificación de la línea germinal
L93	S	L	Reduce el potencial sitio de isomerización

Ejemplo 5

Afinidad al receptor y selectividad de las variantes del anticuerpo 70

[0166] Se generaron variantes de región constante del anticuerpo 70. La región variable de cadena pesada del anticuerpo 70 se sintetizó en la estructura con los dominios constantes de isotipo de IgG humana descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpo 70 variantes

Variantes del Anticuerpo 70	SEQ ID NO
Anticuerpo 70a	33
Anticuerpo 70b	35
Anticuerpo 70c	47
Anticuerpo 70f	49

[0167] La IL-15 se une y señala a través de un complejo compuesto por IL-15R α , IL-2R β e IL-2R γ . Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para unirse a la IL-15R α , así como a las citocinas que comparten el receptor común IL-2R β / γ , como la IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21. Las variantes del anticuerpo 70 no se unieron a IL-15R α , IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21.

[0168] La unión de las variantes del anticuerpo 70 a la IL-15 humana complejada con el receptor alfa de IL-15 se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial en un sistema BIACORE® T200 (GE Healthcare) utilizando un chip sensor de proteína A (GE Healthcare). Los anticuerpos se capturaron en la segunda celda de flujo hasta un nivel de 150-200 RU. Las citocinas purificadas se diluyeron a 10 μ g/mL en HBS-EP+. La unión se midió inyectando 45 μ l de cada citocina a un caudal de 30 μ l/min en ambas celdas de flujo y dejando 180 s de tiempo de disociación. La superficie del chip se regeneró entre ciclos con dos pulsos de 10 segundos de hidróxido de sodio 50 mM. El tampón utilizado fue HBS-EP+ (GE Healthcare) y todas las interacciones se midieron a 25 °C con una frecuencia de recogida de datos de 10 Hz.

[0169] En la Figura 36 se muestra un resumen de los datos de resonancia de plasmón superficial. La afinidad puede medirse por la KD (la constante de disociación de equilibrio entre el anticuerpo y su antígeno). Las variantes del anticuerpo 70 presentaron los valores más bajos de KD (de 0,133 a 0,193 nM), en comparación con el anticuerpo 4 (KD media = 0,629 nM) y AMG714 (KD media = 1,84 nM). La gran diferencia en la KD entre las variantes del anticuerpo 70 y AMG714 se debe a la velocidad de disociación (kd). La IL-15 se disocia del AMG714 diez veces más rápido que la velocidad de disociación de la IL-15 de las variantes del anticuerpo 70. Una vez unido a la IL-15, el anticuerpo 70 y sus variantes permanecen unidos durante más tiempo y, por lo tanto, son superiores en la inhibición de la actividad de la IL-15. Esto se

comprobó en un ensayo de potencia basado en células.

[0170] La potencia de las variantes del anticuerpo 70 y AMG714 se evaluó en el ensayo de proliferación de NK-92 con IL-15 complejo con el receptor alfa de IL-15 a 25 pM (EC_{50}) para inducir la proliferación celular como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 37 y la Tabla 6 muestran que la IC_{50} de las variantes del anticuerpo 70 era de 83 a 98 veces inferior a la IC_{50} de AMG714. Por lo tanto, el anticuerpo 70 fue superior en la inhibición de la actividad de IL-15 en un ensayo de potencia basado en células.

Tabla 6: Valores IC_{50} de los anticuerpos anti-IL-15 en el ensayo de proliferación NK-92

Anticuerpo	IC_{50} promedio (pM)	Dev. estándar	IC_{50} mín (pM)	IC_{50} máx (pM)
AMG714	1303.2	666.2	377.8	2653.9
Anticuerpo 70a	14.7	3.8	10.2	22.0
Anticuerpo 70b	13.3	2.5	10.6	16.6
Anticuerpo 70e	15.7	4.7	11.7	20.9
Anticuerpo 70f	14.6	5.0	7.3	29.8

[0171] Estudios posteriores con el anticuerpo 70F dieron como resultado una afinidad media por el epítipo con una KD de 430pM. En conjunto, estos resultados sugieren que las variantes del anticuerpo 70 tienen mejor capacidad de unión, afinidad y potencia frente a la IL-15 humana en comparación con AMG714.

Ejemplo 6

Mapa de epítopos del anticuerpo 70

[0172] El mapeo de epítopos se realizó mediante experimentos de barrido de alanina. Se llevó a cabo un análisis de modelización para determinar los probables residuos expuestos de la IL-15 que no intervenían en la unión de la IL-15R α . A continuación se diseñaron constructos de IL-15 en los que cada uno de estos residuos teóricamente expuestos se sustituía por una alanina. La lista de estas variantes figura en la Tabla 7

Tabla 7: lista de variantes de IL-15 alanina

Residuo	Posicion	Porcentaje de exposici3n de solvente de cadena lateral
N	1	37.7
V	3	52
N	4	55
S	7	55.1
D	8	26.8
K	10	66.1
K	11	53.6
E	13	36.2
D	14	65.5
L	15	35.2
Q	17	70.7
S	18	79.1
H	20	94.5
S	25	24
D	30	79.8
H	32	57.2
P	33	61.1
S	34	69.8
K	36	46
K	41	63.6
Q	48	61.4
D	56	43.7
A	57	66.7
H	60	56.4
D	61	61
E	64	70.4
I	69	64.6
L	69	31.6
N	72	59.6
S	75	70.2
N	77	77.9
N	79	96.5
V	80	96.9
T	81	91.5
E	82	42.9
S	83	93.8
K	85	65.7
E	92	64.1
K	94	50.5
N	95	59.2
K	97	77.1
E	98	37.6
Q	101	49.5

(continuación)

H	105	55.2
Q	108	60.7
M	109	55.4
I	111	41.3
N	112	83.3

[0173] A continuación, estas construcciones se coexpresaron con IL-15R α y se analizó el sobrenadante de los cultivos de expresión para determinar la expresión de proteínas y la unión al anticuerpo 70a mediante SPR.

[0174] El tampón utilizado fue HBS-EP+ (GE Healthcare). Todas las interacciones se midieron a 25 °C y la frecuencia de recogida de datos se fijó en 10 Hz. Para el análisis se utilizaron los datos del FC2-1. Los sensorgramas resultantes se analizaron creando dos puntos de informe personalizados, cada uno calculado para una ventana de 5 s que comenzaba 10 s después de la inyección de la muestra ("unión temprana") o 10 s antes del final de la disociación ("unión tardía"). Estos valores se restaron de los valores para el control no transfectados y una tasa de disociación relativa se estimó en primer lugar, tomando una relación de estos dos puntos de informe personalizado ('tarde vinculante'/'temprano vinculante') y, a continuación, tomando los valores resultantes como una fracción del valor calculado para el tipo salvaje humano IL-15 complejo con la IL-15 Receptor-alfa (datos no mostrados).

[0175] Para confirmar los resultados del análisis del sobrenadante, las muestras que mostraron una tasa de disociación más rápida en comparación con la IL-15 humana de tipo salvaje complejada con el Receptor-alfa de IL-15 se purificaron y se volvieron a analizar mediante SPR. Se utilizó un chip sensor de proteína A (GE Healthcare) para capturar el anticuerpo 70a en la segunda celda de flujo hasta un nivel de captura de 150-200 RU. Las construcciones de escaneo de IL-15 alanina purificadas se diluyeron a 10 μ g/mL en HBS-EP+ y luego se realizó una serie de dilución de 2 veces. La unión se midió inyectando 45 μ l de cada dilución a un caudal de 30 μ l/min a través de ambas celdas de flujo y permitiendo 600 s de tiempo de disociación. La superficie del chip se regeneró entre ciclos con un pulso de 10 segundos de hidróxido de sodio 50 mM. El tampón utilizado fue HBS-EP+ (GE Healthcare). Todas las interacciones se midieron a 25 °C y la frecuencia de recogida de datos se fijó en 10 Hz. Los datos de Fc2-1 se utilizaron para el análisis y los sensorgramas generados se ajustaron mediante una ecuación de Langmuir 1:1 (utilizando el ajuste local Rmax) para determinar la KD. Los datos se muestran en la Figura 38 para todas las variantes de IL-15 alanina co-expresadas con IL-15R α que mostraron una reducción en la unión a los anticuerpos anti-IL-15 probados. El anticuerpo 70a tenía una baja unión a la IL-15 mutada con una sustitución Q108A. AMG714 no tiene unión o tiene una unión significativamente reducida a IL-15 mutada con las siguientes sustituciones de aminoácidos: E98A, Q101A, H105A y Q108A. Estos resultados indican que la mutación de estos 4 aminoácidos interrumpe la unión de AMG714 al complejo de IL-15 con el Receptor-alfa de IL-15, y sólo la mutación de Q108 interrumpe la unión del Anticuerpo 70a al complejo de IL-15 con el Receptor-alfa de IL-15. Los resultados en la Figura 38 muestran que para los residuos en IL-15 que fueron probados, la unión del anticuerpo AMG714 se reduce a la alteración de los residuos, mientras que la unión del anticuerpo 70a no se redujo por la alteración dada la alta afinidad del anticuerpo para IL-15; sólo la alteración de Q108 en IL-15 dio lugar a la reducción de unión por el anticuerpo 70a.

[0176] Dado que ambos anticuerpos (Anticuerpo 70a y AMG714) tenían baja o ninguna unión al mutante Q108A de IL-15, se realizó una prueba adicional en el Anticuerpo 70a con otro anticuerpo anti-IL-15, el cual se unió al complejo Q108 y al complejo IL-15 de tipo salvaje con igual afinidad demostrando que el mutante Q108A está correctamente plegado. El escaneo de alaninas identifica los residuos que, al mutar, pueden interrumpir la unión del anticuerpo a la IL-15. Para determinar los residuos exactos que entran en contacto con la IL-15 y determinar así el epítipo de unión del anticuerpo 70a, se caracterizó mediante cristalografía de rayos X la interacción del anticuerpo 70a con la IL-15 humana.

[0177] En preparación para los experimentos de cristalización, la IL-15 humana recombinante fue expresada y purificada a partir de bacterias. El anticuerpo 70a Fab (donde FAB es fragmento de unión a antígeno) se preparó por escisión mediada por papáina de la bisagra del anticuerpo, que separa el anticuerpo FAB del Fc. FAB se purificó mediante métodos estándar de cromatografía de proteína A y se complejó con IL-15. FAB:IL-15 se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se preparó para el cribado de cristalización utilizando cribas de cristalización de matriz dispersa. Los cristales finales utilizados para la recogida de datos de difracción se formaron en 10% de polietilenglicol (PEG) 20000, 20% de éter monometílico (MME) PEG 500, 30 mM de CaCl₂, 30 mM de MgCl₂, 100 mM de mezcla tampón no especificada de imidazol/cacodilato sódico/MES (ácido)/Bis-Tris, pH 6,5. Los datos de difracción se recogieron hasta 2,25 Å en la línea de luz i04 de la instalación Diamond Synchrotron. La estructura se resolvió mediante sustitución molecular utilizando estructuras publicadas de moléculas humanas de IL-15 y FAB como plantillas para la construcción del modelo. La estructura se refinó iterativamente frente a los datos experimentales hasta valores R/Rfree de 23,6/28,9. La estructura muestra que las regiones variables del anticuerpo 70a se unen a los sitios de unión de IL-2R γ e IL-2R β de la IL-15 humana, bloqueando así la interacción de esas unidades receptoras con la IL-15 (figuras 39A y 39B). Esto se demuestra además observando las interacciones de las cadenas laterales de la IL-15 con las cadenas laterales del FAB, comparándolas con

las cadenas laterales de la IL-15 que interactúan con la IL-2R γ y la IL-2R β y buscando cadenas laterales o residuos comunes a ambas interacciones.

[0178] La Tabla 8 enumera las interacciones entre las cadenas laterales de IL-15 y las cadenas laterales del fragmento FAb del anticuerpo 70a. Las cadenas laterales del anticuerpo 70a FAb que entran en contacto con la IL-15 forman el paratopo del anticuerpo 70a y anticuerpos relacionados. Las interpretaciones presentadas en la tabla corresponden a: "interacciones hidrofóbicas" - interacciones de Van der Waals entre pares de átomos; "mediadas por agua" - enlaces de hidrógeno mediados por agua entre pares de átomos; "enlace de hidrógeno" - enlaces de hidrógeno de heteroátomos entre 2,5- 3,5Å; "enlace de hidrógeno H- π " - enlace de hidrógeno correspondiente a un átomo donante/aceptante dentro de un átomo aromático.

Tabla 8 - Interacciones de cadena lateral de IL-15 con el Fab del anticuerpo 70a

Residuo de IL-15				Fab de anticuerpo 70a		
Residuo	Nombre químico	de átomo	CDR	Residuo	Nombre de átomo químico	Interpretación
20	Ile6	cadena lateral	CDR_L1	Tyr31	Anillo de fenilo	Interacción hidrofóbica
25	Ser7	Carbonilo de estructura principal	CDR_L1	Arg29	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno mediada por hidrógeno
	Lys10	Grupo amino	CDR_L1	Leu28	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno
30	Lys10	Grupo amino	CDR_L1	Arg29	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno
	Lys10	Carbonilo de estructura principal	CDR_L1	Tyr32	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
35	Lys10	Parte alifática de cadena lateral	CDR_L1	Tyr32	Anillo de fenilo	Interacción hidrofóbica
	Glu13	Carboxilato	CDR_H3	Trp99	Nitrógeno de indol	Unión de hidrógeno
40	Glu13	Carboxilato	CDR_L2	Lys51	Amida de estructura principal	Unión de hidrógeno mediada por hidrógeno

(continuación)

5	Glu13	Carboxilato	CDR_L2	Asn53	Nitrógeno de amida	Unión de hidrógeno mediada por hidrógeno
10	Asp14	Grupo carboxilato	CDR_L1	Tyr32	G Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
15	Asp14	Grupo carboxilato	CDR_L2	Lys51	Grupo amino	Unión de hidrógeno
	Ser29	Carbonilo de estructura principal	CDR_H1	Ser32	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
20	Val31	Carbonilo de estructura principal	CDR_H2	Tyr52	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
	Pro81	cadena lateral	CDR_H2	Tyr54	Anillo de fenilo	Interacción hidrofóbica
25	Gln101	Nitrógeno de amida	CDR_H3	Ile97	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno
	Val104	cadena lateral	CDR_H3	Trp99	Grupo indol	Interacción hidrofóbica
30	His105	Nitrógeno de cadena lateral	CDR_H3	Gly98	Amida de estructura principal	Unión de hidrógeno
35	His105	Nitrógeno de cadena lateral	CDR_H1	Ser32	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno
	Gln108	Nitrógeno de amida	CDR_L3	Gly95	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno
40	Gln108	Oxígeno de amida	CDR_L1	Tyr31	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
45	Gln108	Oxígeno de amida	CDR_H3	Gly99	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno mediada por hidrógeno
	Ile111	Carbonilo de estructura principal	CDR_L3	Lys95A	Grupo amino	Unión de hidrógeno
50	Asn112	Nitrógeno de amida	CDR_H1	Trp34	Grupo indol	Unión de hidrógeno H-π
55	Asn112	Carbonilo de estructura principal	CDR_H2	Asn58	Nitrógeno de amida	Unión de hidrógeno
	Thr113	Metilo de cadena lateral	CDR_H2	Tyr56	Anillo de fenilo	Interacción hidrofóbica
60	Ser114	Extremo C	CDR_L3	Lys95A	Grupo amino	Unión de hidrógeno

[0179] Se realizó un análisis similar en la estructura de rayos X del complejo cuaternario del receptor de IL-15 (código pdb 4GS7). La Tabla 9 muestra los residuos de IL-15 importantes para la unión del complejo IL-15 a IL-2R γ e IL-2R β basándose en el enlace de hidrógeno que se produce entre las cadenas laterales de IL-15 y las cadenas laterales de IL-2R γ e IL-2R β .

Tabla 9 - Interacciones de cadena lateral de IL-15 con IL-2Ry e IL-2Rβ

5	Residuo de IL-15		Residuo de IL-2R γ		
	Residuo	Nombre de átomo químico	Residuo	Nombre de átomo químico	Interpretación
10	Asp30	Oxígeno de amida	Asn71	Nitrógeno de cadena lateral	Unión de hidrógeno
	Asp30	Grupo carboxilato	Thr105	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
	His32	Nitrógeno de cadena lateral	Asp73	Grupo carboxilato	Unión de hidrógeno
15	Gln108	Oxígeno de amida	Tyr103	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
	Gln108	Grupo amino	Pro207	Oxígeno de amida	Unión de hidrógeno
	Gln108	Grupo amino	Ser211	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
20	Asn112	Grupo carboxilato	Cys160	Sulfuro	Unión de hidrógeno
	Asn112	Grupo amino	Tyr103	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
25	Residuo de IL-15		Residuo de IL-2R β		
	Residuo	Nombre de átomo químico	Residuo	Nombre de átomo químico	Interpretación
30	Asn1	Grupo carboxilato	Thr74	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
	Asp8	Grupo carboxilato	His133	Nitrógeno de cadena lateral	Unión de hidrógeno
	Asp8	Grupo carboxilato	Tyr134	Grupo hidroxilo	Unión de hidrógeno
35	Glu64	Grupo carboxilato	Arg42	Grupo amino	Unión de hidrógeno
	Asn65	Grupo carboxilato	Arg42	Grupo amino	Unión de hidrógeno
	Asn65	Grupo carboxilato	Arg42	Grupo amino	Unión de hidrógeno
40	Ser7	Grupo hidroxilo	Glu136	Grupo carboxilato	Unión de hidrógeno
	Asn65	Nitrógeno de cadena lateral	Gln70	Carbonilo de estructura principal	Unión de hidrógeno

[0180] El área superficial accesible al disolvente, formada en la interacción del anticuerpo 70 con la IL-15 humana, es de 2270,9 Å². Este valor se calculó en PYMOL utilizando el método de Strake y Rupley (1973) J. Mol. Biol. 79: 351-71.

[0181] La comparación de las interacciones de cadena lateral del anticuerpo 70a FAb con IL-15 y las interacciones de cadena lateral de las cadenas beta y gamma de IL2R con IL-15 identifica varios residuos comunes. S7 (Ser7) forma un enlace de hidrógeno con IL-2Rβ, y Q108 (Gln108) y N112 (Asn112) forman enlaces de hidrógeno con IL-2Ry, (Figuras 39C-39E). Estos 3 residuos también forman el epítipo de la IL-15 al que se une el anticuerpo 70a FAb y forma enlaces de hidrógeno, impidiendo así la interacción de la IL-15 con la IL-2Rβ y la IL-2Ry.

[0182] El triple motivo de tirosina que comprende Y52/54/56 en CDRH2, descubierto durante la maduración de afinidad y potencia del anticuerpo 70a, es un determinante clave de unión del anticuerpo con IL-15 humana. Examinando la estructura cristalina (Figuras 39F-39H) se puede ver que este motivo vela y protege los residuos hidrofóbicos alrededor de la hélice-4 de la IL-15 impidiendo la solvatación y estabilizando la estructura.

Ejemplo 7

Detección por Citometría de Flujo de variantes de unión a IL-15 en células humanas primarias

[0183] Para caracterizar aún más el anticuerpo, se probó su capacidad para unirse a IL-15 en células humanas primarias. Se aislaron y purificaron células mononucleares periféricas humanas (PBMC) a partir de buffy coats utilizando Lymphoprep (Axis-Shield, Lymphoprep) y se evaluó la unión del Ab principal mediante análisis de citometría de flujo.

[0184] Se sembraron inicialmente 1×10^6 PBMC viables por pocillo, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Sigma/Corning) y se tiñeron con colorante Zombie Violet (Biolegend) durante 20 min a 4°C. Las células se tiñeron además con el bloque TruStain FcX Fc (Biolegend) diluido en tampón FACS durante 10 min a temperatura ambiente. Para la tinción de superficie, las PBMC se tiñeron con 10 µg/mL de anticuerpos de prueba o de control del isotipo (enumerados en la Tabla 10), y se incubaron durante 20 min a 4°C. Tras la inmunotinción, las muestras se fijaron con BD cytofix/cytoperm (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Para la tinción intracelular, las PBMC se fijaron con BD cytofix/cytoperm (BD Biosciences) antes de la tinción. Las muestras se analizaron utilizando un BD FACSCanto II (BD Biosciences).

[0185] Se realizó una discriminación inicial de dobletes en todos los eventos celulares para eliminar los agregados celulares del análisis. Las células vivas se seleccionaron tras excluir las células muertas mediante un colorante de viabilidad. la activación inicial de los leucocitos separó las células en las siguientes categorías: Células CD3⁺CD8⁻, células T CD3⁺CD8⁺ y células T CD3⁺CD8⁻ (putativamente CD4⁺). Un análisis más detallado de la población CD3 separó las células en células B CD19⁺ y una población de células CD19⁻. Esta última población se activó de nuevo para seleccionar de células NK CD56dimCD16⁺ y CD56briCD16dim⁻. Además, basándose en los niveles de expresión de CD14 y CD16, los monocitos (población Hi SSC) se subdividieron posteriormente en los tres principales subconjuntos de monocitos: clásico (CD14⁺ CD16⁻), intermedio (CD14intCD16int) y no clásico (CD14dimCD16⁺).

[0186] El análisis de los datos se realizó utilizando el software de análisis FLOWJO® V.10.

Tabla 10. Lista de anticuerpos y conjugados.

Especificidad	Conjugado	Clon	Especies e isotipo	Proveedor
Anticuerpos antihumanos				
CD3	APC-Vio770	REA613	IgG1 humana recombinante	Miltenyi Biotec
CD8	VioGreen	BW135/80	IgG2a de ratón	Miltenyi Biotec
CD14	PerCP	TUK4	IgG2a κ de ratón	Miltenyi Biotec
CD16	FITC	REA423	IgG1 humana recombinante	Miltenyi Biotec
CD19	PE	LT19	IgG1 κ de ratón	Miltenyi Biotec
CD56	PE Vio770	AF12-7H3	IgG1 de ratón	Miltenyi Biotec
IL-15	iFluor647	Anticuerpo 70a	IgG1 λ humana	Interior
	iFluor647	Anticuerpo 70b	IgG1 λ humana	Interior
	iFluor647	Anticuerpo 70c	IgG4 λ humana	Interior
	iFluor647	Anticuerpo 70f	IgG4 λ humana	Interior
Anticuerpos de control de isotipo				
Anti-KLH C3 IgG1	iFluor647		IgG1 humana	Interior
Anti-KLH C3 IgG4	iFluor647		IgG4 humana	Interior
APC: Alofococianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP: Proteína de clorofila peridina				

[0187] En la Figura 40 se muestra una unión representativa de variantes del anticuerpo 70 sobre monocitos. Se detectó una unión moderada de las variantes del anticuerpo 70 en la superficie celular de todos los subconjuntos de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos). Se observaron niveles de unión intracelular más elevados en todos los subconjuntos de monocitos. Se encontraron diferencias marginales en los niveles de detección de la unión entre ambas variantes del anticuerpo 70. No se detectó ninguna unión o se detectó una unión baja en la superficie en células T CD4⁺ y CD8⁺ y en todos los subconjuntos de células NK, datos no mostrados. Estos resultados indican que las variantes del anticuerpo 70 fueron capaces de unirse a la IL-15 humana en células primarias.

Ejemplo 8

Eficacia de los anticuerpos anti-IL-15 en modelos animales

8.1 Neutralización *in vivo* de IL-15 humana y de IL-15 complejada con el receptor alfa de IL-15

[0188] Este estudio se llevó a cabo para determinar hasta qué punto la IL-15 humana recombinante o el complejo IL-15/IL-15R α podían inducir la expansión de células NK y NKT en ratones C57BL/6, y hasta qué punto un anticuerpo ejemplar de la presente invención podía neutralizar dicha inducción.

[0189] Se administró a grupos de 8 ratones C57BL/6 machos una dosis única del anticuerpo 70f (a 10, 3, 1, 0,3 ó 0,1 mg/kg) o del control del isotipo (10 mg/kg) i.p. el Día 1 (1 hora antes de la primera inyección de citoquinas). Las células NK1.1⁺ se indujeron mediante inyección i.p. del complejo IL-15 recombinante (donde IL-15R α es una quimera Fc) (1,5 μ g /ratón) diariamente durante 3 días desde el Día 1 al Día 3. El día 4, se recogieron los bazo de los ratones. Se prepararon suspensiones celulares a partir del bazo total de cada ratón y se contaron en un contador celular automatizado. El número de NK1.1⁺ se evaluó a partir de suspensiones celulares mediante citometría de flujo basada en el % del total de esplenocitos. Se utilizó anti-NK-1.1 de ratón conjugado con ficoeritrina (BD553165). Se adquirieron 50.000 eventos/muestra en el citómetro.

[0190] Como se muestra en la Figura 41, la inyección del complejo IL-15/IL-15R α indujo la acumulación de células NK1.1⁺ en el bazo de ratones. Esta acumulación pudo inhibirse significativamente mediante el tratamiento con el anticuerpo 70f a partir de 0,3 mg/kg, pero no con un anticuerpo de control del isotipo humano.

8.2 Efecto de los anticuerpos anti-IL-15 sobre el número de células NK circulantes en primates no humanos

[0191] Se ha demostrado previamente que la administración de anticuerpos anti-IL-15 disminuye el número de células NK circulantes en monos cynomolgus (Lebrec et al. (2013) J. Immunol. 191:5551-5558). Para caracterizar mejor el anticuerpo 70, se probó *in vivo* la consecuencia de antagonizar la actividad de la IL-15 sobre las células NK circulantes. Grupos de 4 monos cynomolgus macho recibieron una única inyección intravenosa de anticuerpo 70f a 1 o 10 mg/kg o de anticuerpo 70b a 10 mg/kg. El número circulante de células NK se cuantificó mediante la expresión del marcador de células NK CD159a (NKG2A), determinada por citometría de flujo de muestras de sangre total antes de la dosis y en los días 2, 5, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 102, 120 y 150 del estudio.

[0192] En la Figura 42 se muestran los puntos temporales individuales para cada mono y la mediana (línea sólida) de los recuentos de células NK en sangre periférica. La administración del anticuerpo 70f a 1 o 10 mg/kg o del anticuerpo 70b a 10 mg/kg produjo una disminución significativa por debajo del número de células NK circulantes antes de la dosis a partir del día 7 del estudio, que se mantuvo hasta el día 120 del estudio en la mayoría de los animales.

8.3 Efecto de los anticuerpos anti-IL-15 en el modelo rhesus de enfermedad celíaca en primates no humanos

[0193] Se ha descrito una enfermedad diarreica crónica denominada "Enteropatía sensible al gluten" en un subgrupo de monos rhesus cautivos alimentados con piensos que contienen gluten. Cuando fueron alimentados con una dieta que contenía gluten, los macacos sensibles al gluten mostraron signos y síntomas de enfermedad celíaca, incluida la presencia de autoanticuerpos transglutaminasa tisular intestinal, anticuerpos séricos antigliadina, disminución de la reabsorción de nutrientes, disminución del metabolismo xenobiótico, atrofia de las vellosidades, disminución de la diversidad del microbioma intestinal, diarrea crónica, pérdida de peso, predisposición al cáncer y asociación inmunogenética (ligada al MHC II) (Bethune MT et al. (2008) PLoS ONE. 3(2):e1614). Una dieta sin gluten revirtió estas características clínicas, histológicas y serológicas, mientras que la reintroducción del gluten en la dieta provocó una rápida recaída. Curiosamente, las biopsias de macacos sensibles al gluten mostraron una sobreexpresión de IL-15 en los tejidos del yeyuno (Sestak K et al. (2016) Nutrients. 8(7):401.)

[0194] La capacidad de un anticuerpo anti-IL-15 de la invención para inhibir los síntomas inducidos por el gluten se probó en macacos rhesus con enteropatía sensible al gluten. Las dietas sin gluten (GFD) y con gluten (GD) se administraron a los 6 macacos sensibles al gluten para inducir las etapas de remisión inmunológica y recaída, respectivamente, caracterizadas por respuestas de anticuerpos plasmáticos antigliadina (AGA) y antitransglutaminasa 2 (TG2) positivas y negativas, como se describe en Sestak et al., 2015; 2016. Tras inducir la recaída de anticuerpos AGA/TG2, se administró

semanalmente el anticuerpo 70f por vía intravenosa (i.v.) en una dosis de 10 mg/kg (BW) a tres animales durante 28 días (Grupo 1) y a tres animales durante 90 días (Grupo 2) mientras los macacos seguían siendo alimentados con una dieta que contenía gluten. Se tomaron biopsias intestinales en las fases del estudio para medir la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas, así como el recuento de linfocitos intraepiteliales (IEL). Se midió la presencia de autoanticuerpos contra la transglutaminasa-2 y anticuerpos antigliadina a partir de muestras de suero. El diseño del estudio se muestra en la Figura 45A.

[0195] La evaluación de los anticuerpos plasmáticos AGA y TG2 (IgG), enteropatía por GS, incluida la evaluación morfológica de las alturas de las vellosidades del intestino delgado frente a las profundidades de las criptas, es decir, las relaciones V/C, se realizó de acuerdo con protocolos previamente establecidos Sestak et al., 2015; 2016. Se recogieron biopsias del intestino delgado en momentos correspondientes a la recaída inmunológica (GD) y a la remisión (GFD), así como al inicio y al final del periodo de tratamiento con anticuerpos Anti-IL-15. Las biopsias se recogieron y procesaron para el recuento de linfocitos intraepiteliales (LIE) según lo descrito por Sestak et al., 2016.

Resultados:

[0196] La evaluación de los tejidos de biopsia de yeyuno recogidos de macacos rhesus sensibles al gluten antes, durante y después del tratamiento con anticuerpos anti-IL15 reveló una mejora de la enteropatía tras la evaluación morfológica de la arquitectura del tejido del intestino delgado, es decir, la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (V/C). Con una dieta a base de gluten, los macacos de ambos grupos presentaron una pérdida significativa de la altura de las vellosidades y de la arquitectura tisular de la profundidad de las criptas (Figura 45B). Las relaciones V/C mejoraron significativamente con el tratamiento con anticuerpos anti-IL15 ($p < 0,0001$) beneficiando a ambos grupos de macacos celíacos, ya que todos los animales tratados mostraron un aumento de la altura de sus vellosidades intestinales delgadas, es decir, de las relaciones V/C hasta un punto comparable con los controles sanos emparejados por edad (Figura 45B).

[0197] Para evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpos Anti-IL-15 en macacos rhesus sensibles al gluten, se compararon los recuentos de IELs del intestino delgado entre muestras de biopsia tomadas en puntos temporales que representaban la dieta GD (6 meses), GFD (3 meses), y el tratamiento con anticuerpos Anti-IL-15 (días 35 y 61) mientras estaban en GD (Figura 45C). En comparación con el recuento de IEL tomado en un momento anterior, cuando los animales estaban en un GD, ambos grupos de tratamiento con anticuerpos Anti-IL15 tuvieron recuentos de IEL significativamente más bajos ($p < 0,0001$). A pesar de haber sido alimentados con una dieta que contenía gluten, el tratamiento con anticuerpos anti-IL15 medido en el día 35 post-tratamiento (TD35) en el Grupo 1 y en el TD61 en los macacos del Grupo 2, resultó en una mayor disminución de IELs ($p < 0.0001$) que la asociada con 3 meses de GFD (Figura 45C).

[0198] Antes del tratamiento, los niveles de anticuerpos antigliadina aumentaron con la exposición al gluten y disminuyeron con una dieta sin gluten en 5/6 animales (el animal 1B no tuvo respuesta AGA), lo que indica que los animales eran sensibles al gluten (Figura 45D). El tratamiento con anti-IL-15 redujo los anticuerpos antigliadina (AGA) en 5/5 animales que presentaban niveles elevados de AGA antes del tratamiento, lo que resultó sorprendente dado que estos animales seguían expuestos a una DG.

[0199] En resumen, el tratamiento con anticuerpos anti-IL15 atenuó la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten (mejoró la relación V/C), atenuó la inflamación de la mucosa del intestino delgado inducida por el gluten (redujo los recuentos de IEL) y atenuó los anticuerpos séricos inducidos por el gluten (redujo los anticuerpos antigliadina), según se midió en un modelo de macaco rhesus de enfermedad celíaca.

[0200] La divulgación no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es susceptible de variación y modificación dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2, y que comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 16; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 17; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 20; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 25; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 28; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 29, en el que el anticuerpo se une específicamente a la IL-15 humana.
- 10 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 18.
- 15 3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende:
- (a) una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 26 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 30, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y, opcionalmente, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5 y/u opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6;
- 20 (b) una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8 y/u opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 9;
- 25 (c) una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 26 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 455 y/u opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 456;
- 30 (d) una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 30, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 457 y/u opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 458; o
- 35 (e) una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 519, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 459, y opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 460.
- 40 4. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 19, una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 27, una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 31, y una FR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 14.
- 45 5. El anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 7 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 9.
- 50 6. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5;
- 60 (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 8;
- (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 455; o
- 65 (d) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y una

región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 459.

7. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:8;
- (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:505;
- (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:509;
- (d) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:510;
- (e) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:455;
- (f) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:505;
- (g) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:506;
- (h) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:5;
- (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:509; o bien
- (j) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:454 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:510.

8. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo comprende un dominio constante IgG, opcionalmente en el que el anticuerpo comprende:

- (a) un dominio constante IgG4, opcionalmente en el que el dominio constante IgG4 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º: 49, SEQ ID N.º: 44, SEQ ID N.º: 45, SEQ ID N.º: 46, SEQ ID N.º: 47, SEQ ID N.º: 48, SEQ ID N.º: 50 y SEQ ID N.º: 51;
- (b) un dominio constante IgG1, opcionalmente en el que el dominio constante IgG1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º: 32, SEQ ID N.º: 33, SEQ ID N.º: 34, SEQ ID N.º: 35, SEQ ID N.º: 36, SEQ ID N.º: 37, SEQ ID N.º: 38 y SEQ ID N.º: 39; o
- (c) un dominio constante IgG2, opcionalmente en el que el dominio constante IgG2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N.º: 40, SEQ ID N.º: 41, SEQ ID N.º: 42 y SEQ ID N.º: 43.

9. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que:

- (i) el anticuerpo inhibe la proliferación de células Natural Killer (NK) a una IC_{50} de aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 900 pM en un ensayo de proliferación de células NK, opcionalmente

en el que el anticuerpo inhibe la proliferación de células NK a una IC_{50} de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 60 pM en un ensayo de proliferación de células NK, y/o
en el que el anticuerpo inhibe la proliferación de células NK a una IC_{50} de aproximadamente 5 pM a aproximadamente 35 pM en un ensayo de proliferación de células NK; y/o

- (ii) el anticuerpo es capaz de neutralizar la IL-15.

10. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo tiene una afinidad por la IL-15 humana que incluye una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente $1,8 \times 10^{-9}$ M determinada por resonancia de plasmón de superficie o en el que la constante de disociación (KD) es inferior a 1×10^{-9} M.

11. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5.

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo:

- (i) comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:6; o
- (ii) comprende además una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:49; o
- (iii) comprende además una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:49, y en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º:6.

- 5 **13.** El anticuerpo según la reivindicación 11 o 12, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 4 y en la que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5.
- 14.** Una composición, que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 **15.** El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, la enfermedad celíaca refractaria, la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes tipo 1, la alopecia areata, la leucemia linfocítica granular de células T grandes, una enfermedad autoinmune, una enfermedad autoinmune en la que la IL-15 está desregulada, una enfermedad inflamatoria o afección inflamatoria, o una enfermedad inflamatoria o afección inflamatoria en la que la IL-15 está desregulada.
- 15 **16.** Un método *in vitro* para detectar IL-15 o un complejo de IL-15 y receptor alfa de IL-15 en una muestra de tejido aislada de un sujeto, que comprende poner en contacto el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 con una muestra de tejido aislada de un sujeto para formar un anticuerpo-IL-15 complejoado con el receptor alfa de IL-15, y detectar el complejo en la muestra de tejido.
- 20 **17.** Una célula transformada que expresa el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 18.** Un método de producción de un anticuerpo que se une específicamente a IL-15 humana, en el que la IL-15 está complejada con IL-15R α que comprende cultivar la célula de la reivindicación 17.
- 25 **19.** Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada variable de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 1 y/o que codifica una cadena ligera variable de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 2.
- 20.** Un vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 19.
- 30 **21.** Una célula (i) transfectada con el vector según la reivindicación 20 o (ii) que comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable del anticuerpo.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

Clon	Sobrenadantes de hibridoma incubados en					
	cells transfected with (CELISA)...		placas recubiertas con (ELISA)...			
	complejo IL-15		complejo IL-15		receptor libre IL-15α	
	rfu	% positivo	rfu	% positivo	rfu	% positivo
ANTICUERPO 1A6	120	12%	150	18%	93	16%
ANTICUERPO 1B3	1160	120%	1629	191%	1488	258%
ANTICUERPO 2D	972	98%	1280	142%	30	6%
ANTICUERPO 4	1534	149%	1242	140%	97	19%
ANTICUERPO 10A	1435	119%	1222	139%	57	11%
ANTICUERPO 10B	1471	122%	1160	132%	72	14%
ANTICUERPO 10F	1235	102%	831	95%	96	19%
ANTICUERPO 13E	1435	118%	1362	167%	113	16%
ANTICUERPO 5E	994	100%	810	94%	41	10%
ANTICUERPO 10H	1137	119%	1752	217%	1440	316%
ANTICUERPO 10F-7	43	4%	152	19%	88	19%

Figura 2A

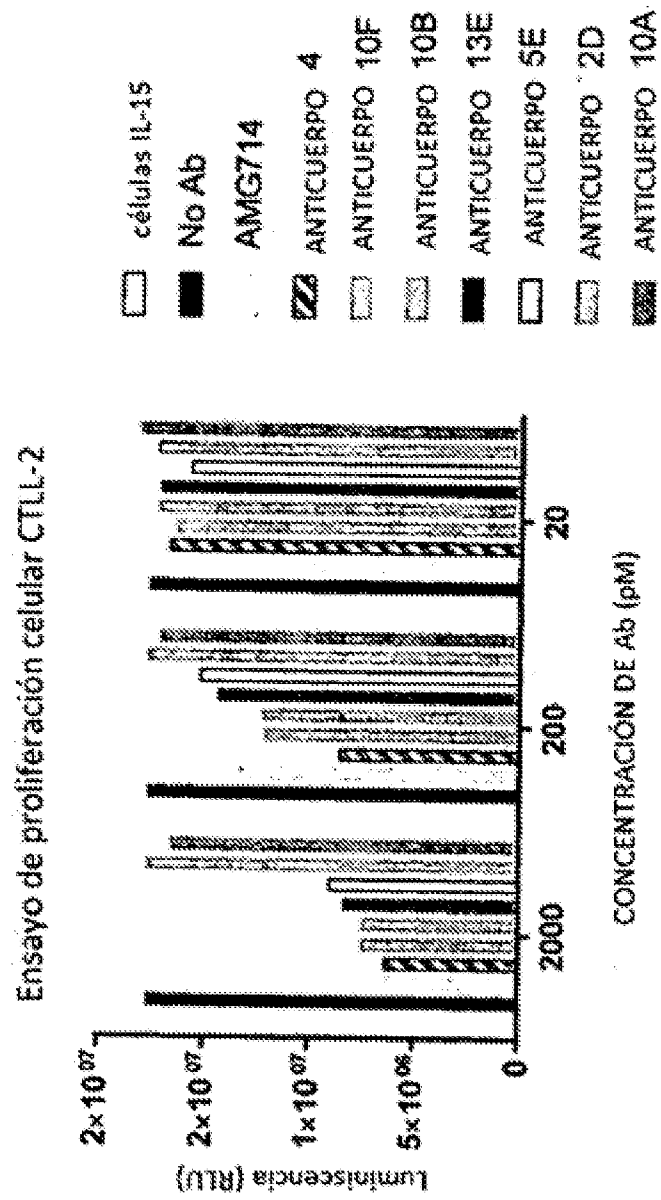


Figura 2B

Ensayo de proliferación celular CTLL-2

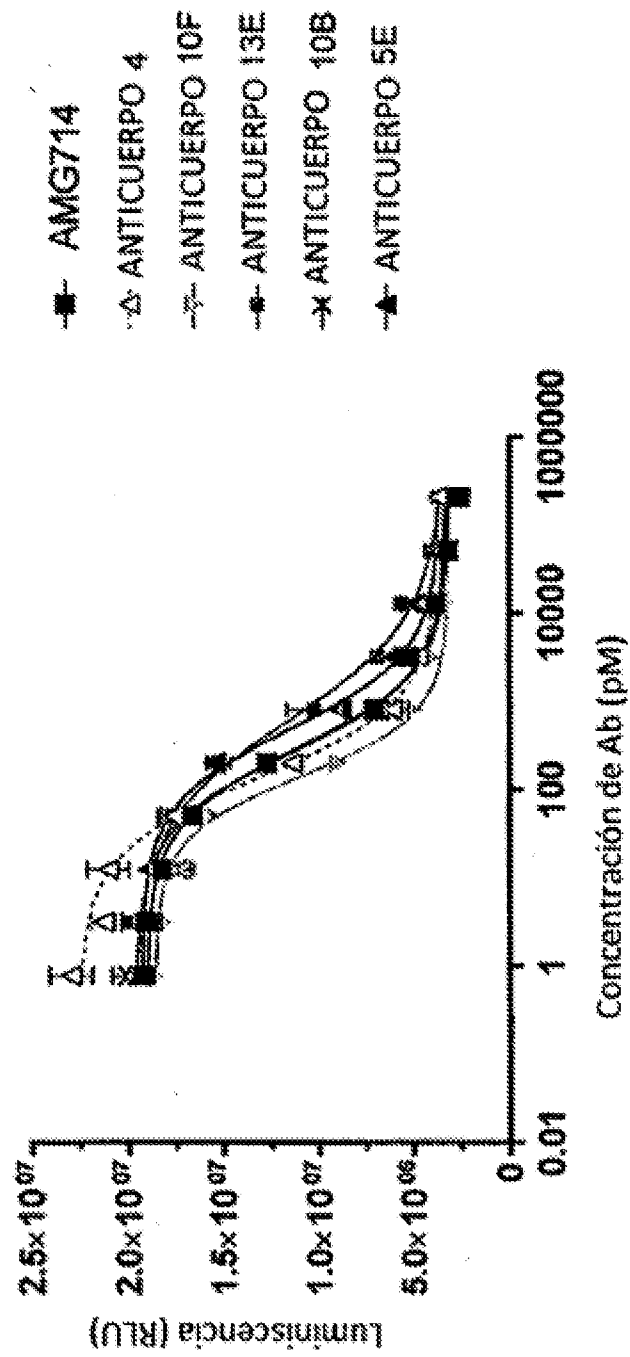


Figura 3

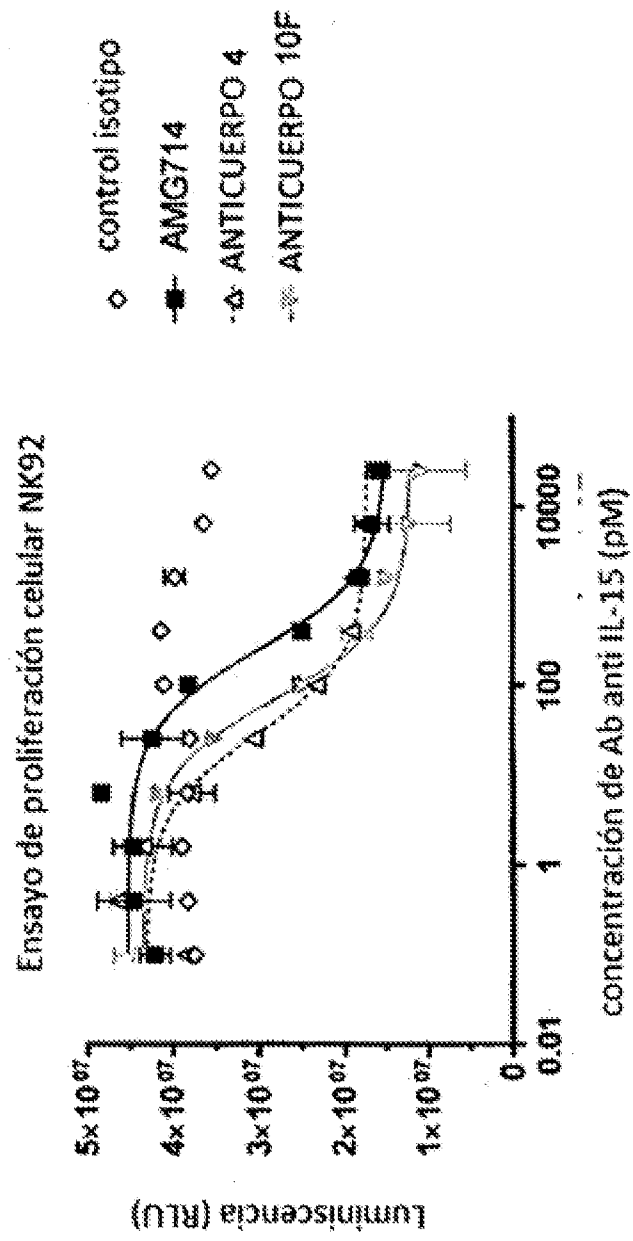


Figura 4

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Me)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardea	unión tar/ unión temp
1	VL_Q024A	338.1	1.35E+05	1.55E-04	1.15E-09	138.8	133.3	129.6	0.972
1	VL_Q024L	335.6	1.39E+05	1.60E-04	1.15E-09	139.5	134.5	130.6	0.971
1	VL_Q024Y	324.8	1.39E+05	1.45E-04	1.04E-09	134.3	129.4	126	0.974
1	VL_Q024W	358.3	1.36E+05	1.40E-04	1.03E-09	148.1	142.6	139	0.975
1	VL_Q024K	336.6	1.28E+05	1.65E-04	1.29E-09	134.8	128.4	124.6	0.970
1	VL_G025Q	309.3	8.36E+04	3.88E-04	4.64E-09	110.8	94.3	89.9	0.953
1	VL_G025W	387.8	7.42E+04	7.03E-03	9.47E-08	121	83.8	39.8	0.475
1	VL_G025S	370.9	8.85E+04	3.94E-04	4.45E-09	135	117.3	111.6	0.951
1	VL_G025Y	348.7	7.23E+04	3.65E-03	5.04E-08	115.4	85.9	57.3	0.667
1	VL_G025H	384.3	9.15E+04	2.90E-04	3.17E-09	140.6	123.5	118.8	0.962
1	VL_D026A	353	1.21E+05	1.65E-04	1.36E-09	139.2	131	127.4	0.973
1	VL_D026Q	417.8	1.12E+05	1.81E-04	1.61E-09	160.3	149.7	145.4	0.971
1	VL_D026S	356	1.20E+05	1.60E-04	1.41E-09	140.2	132.1	128.3	0.971
1	VL_D026W	396.7	1.15E+05	1.76E-04	1.53E-09	153.6	144.3	140.1	0.971
1	VL_D026H	366.2	1.19E+05	1.35E-04	1.13E-09	142.2	134.1	130.7	0.975
1	VL_D026K	328.7	1.15E+05	1.79E-04	1.55E-09	128.9	120.3	116.8	0.971

Figura 6

carida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tarde	unión tan/ unión temp
1	VL_D026K	429.2	1.30E+05	4.78E-04	3.69E-09	175.1	167	156.9	0.940
1	VL_I027A	322.1	9.77E+04	1.94E-04	1.99E-09	118.6	106.3	103.1	0.970
1	VL_I027K	385	6.18E+04	7.42E-03	1.21E-07	111.2	70.3	31.5	0.448
1	VL_I027S	412.1	1.25E+05	6.70E-04	5.37E-09	166.8	157.1	144.7	0.921
1	VL_I027D	331.7	1.28E+05	4.64E-03	3.62E-08	131	114.7	68.6	0.598
1	VL_I027Y	329.6	9.76E+04	4.14E-03	4.24E-08	120.6	98.7	62.1	0.629
1	VL_I027H	369.9	1.09E+05	4.82E-03	4.43E-08	137.8	115.4	67.8	0.588
1	VL_I028A	347.2	6.52E+04	1.15E-03	1.76E-08	118	89.7	78.8	0.878
1	VL_I028K	345.7	1.45E+05	1.22E-03	8.45E-09	7	6.7	5.8	0.866
1	VL_I028Q	336.9	5.98E+04	2.86E-03	4.78E-08	108.5	75.3	54.7	0.726
1	VL_I028Y	403.9	5.26E+04	3.02E-04	5.75E-09	126.1	89.3	86	0.963
1	VL_I028D	376.9	1.26E+05	4.93E-04	3.93E-09	7.1	7.4	7.1	0.959
1	VL_R029A	334.2	1.46E+05	1.63E-04	1.12E-09	146	141.3	137.3	0.972
1	VL_R029K	305.7	1.38E+05	1.66E-04	1.20E-09	129.8	124.5	120.9	0.971
1	VL_R029Q	372.9	1.45E+05	1.49E-04	1.02E-09	162.3	157.6	153.6	0.975
1	VL_R029W	339.7	1.35E+05	1.59E-04	1.18E-09	141.7	135.8	132.1	0.973
1	VL_R029S	348.9	1.45E+05	1.69E-04	1.17E-09	152.6	147.9	143.7	0.972

Figura 6

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tarde	unión tar/ unión temp
1	VL_R029L	388.9	1.42E+05	1.51E-04	1.06E-09	171.9	166.7	162.4	0.974
1	VL_R029D	384	1.40E+05	1.50E-04	1.07E-09	167.4	162.4	158.3	0.975
1	VL_R029Y	424.5	1.41E+05	1.39E-04	9.89E-10	180.3	175.3	170.8	0.974
1	VL_R029H	414	1.42E+05	1.35E-04	9.47E-10	177.9	173.3	169.1	0.976
1	VL_N030H	330.4	1.25E+05	3.05E-04	2.45E-09	134.9	127.3	121.9	0.958
1	VL_N030D	421.3	1.35E+05	6.28E-04	4.65E-09	180.2	172.5	159.5	0.925
1	VL_N030Y	357.1	1.39E+05	1.08E-03	7.80E-09	147.6	139.8	122.5	0.876
1	VL_N030W	434.1	1.14E+05	2.75E-03	2.40E-08	169	150.1	110.3	0.735
1	VL_N030S	342.8	1.42E+05	3.42E-04	2.41E-09	146.7	141.2	134.5	0.953
1	VL_N030L	305.5	1.42E+05	3.38E-03	2.38E-08	125.3	114.1	77.6	0.680
1	VL_Y031A	346.4	1.20E+05	3.21E-04	2.67E-09	7.9	7.2	7.1	0.986
1	VL_Y031K	288.3	1.06E+05	2.43E-04	2.29E-09	7.4	6.5	6.3	0.969
1	VL_Y031Q	392.9	1.36E+10	3.54E+02	2.61E-08	19.4	18.2	8.4	0.462
1	VL_Y031S	394	1.59E+05	1.87E-03	1.18E-08	10.7	10.8	9.2	0.852
1	VL_Y031L	3	8.54E+04	4.69E-04	5.49E-09	7.4	5.7	5.4	0.947
1	VL_Y031D	403.2	9.13E+04	5.59E-07	6.13E-12	7.8	7.5	7.6	1.013
1	VL_Y031H	363.6	1.49E+05	8.97E-04	6.00E-09	8.2	8	7.4	0.925

Figura 7

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Me)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tae/ unión temp
1	VL_Y032A	401.9	1.05E+05	7.29E-03	6.94E-08	144	112.8	53	0.470
1	VL_Y032K	281.5	8.23E+04	1.74E-03	2.11E-08	101	82.6	67.8	0.821
1	VL_Y032Q	353.6	9.69E+04	4.54E-04	4.69E-09	140.3	124.6	117.8	0.945
1	VL_Y032W	364.2	1.03E+05	2.06E-04	2.00E-09	138.8	126.1	122.5	0.971
1	VL_Y032S	344.3	2.68E+05	5.85E-03	2.20E-08	15.5	15.4	9.6	0.623
1	VL_Y032L	315	1.00E+05	6.43E-04	6.43E-09	125.5	112	103.6	0.925
1	VL_Y032D	353.2	2.21E+05	3.55E-02	1.61E-07	102.1	65.5	10	0.153
1	VL_Y032H	298.7	1.15E+05	1.80E-04	1.56E-09	122.9	114.5	111.3	0.972
1	VL_A033L	339.6	4.58E+04	3.94E-04	7.31E-09	112.5	73	70.1	0.960
1	VL_A033D	363.2	3.60E+04	6.17E-04	1.71E-08	110.3	61.2	56.9	0.930
1	VL_A033Y	389.5	3.93E+04	8.74E-03	2.22E-07	64.5	31.4	12.9	0.411
1	VL_A033Q	375.6	3.21E+04	9.43E-04	2.94E-08	107.5	55.2	49.7	0.900
1	VL_A033W	384	1.09E+05	3.34E-04	3.06E-09	7.4	7.8	7.2	0.923
1	VL_A033H	383.4	4.35E+04	6.08E-03	1.40E-07	101.8	55.7	29.1	0.522
1	VL_A033K	353.9	1.27E+05	8.64E-04	6.82E-09	7.2	7.2	6.4	0.889
1	VL_S034A	380.3	1.36E+05	1.55E-04	1.14E-09	159.2	153.1	149	0.973
1	VL_S034L	361.4	7.86E+04	1.07E-04	1.36E-09	7.1	5.6	5.5	0.982

Figura 8

corrida #	sustitución aminoácido	nivel capture	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tarde	unión tar/ unión temp
1	VL_S034D	388.7	4.67E+04	8.33E-03	1.78E-07	44.9	24.2	10.3	0.426
1	VL_S034Y	351.5	8.05E+04	6.45E-07	8.01E-12	7.3	6	5.9	0.983
1	VL_S034Q	373.7	8.52E+07	6.82E-01	8.00E-09	9.8	10.3	6.7	0.650
1	VL_S034W	355.6	1.16E+05	2.17E-04	1.87E-09	7.3	6.9	6.5	0.942
1	VL_S034H	378.9	7.57E+05	1.33E-01	1.75E-07	68.3	42.3	7.3	0.173
1	VL_G025K	397.5	5.98E+04	5.25E-04	8.78E-09	125.3	93.7	88.1	0.940
1	VL_G025L	394.7	6.02E+04	4.22E-03	7.01E-08	126.9	86.3	54.6	0.633
1	VL_G025D	395.2	1.33E+05	2.31E-04	1.73E-09	165.4	158.3	152.9	0.966
1	VL_D026Y	470.1	1.18E+05	1.54E-04	1.30E-09	184.5	173.8	169.4	0.975
1	VL_I027Q	421.7	1.03E+05	2.51E-03	2.43E-08	161.2	140.1	105.7	0.754
1	VL_I027W	345.4	7.80E+04	4.75E-03	6.08E-08	121.6	90.7	53.4	0.589
1	VL_I027L	380	1.05E+05	2.35E-03	2.24E-08	150	130.6	100.3	0.768
1	VL_I028S	357.7	5.93E+04	4.48E-03	7.55E-08	114.9	76.6	46.7	0.610
1	VL_I028W	404.6	5.44E+04	5.20E-03	9.57E-08	116.3	71.4	41.9	0.587
1	VL_I028H	398.6	5.97E+04	7.56E-04	1.27E-08	134.7	99.8	91.6	0.918
1	VL_N030K	320.8	7.47E+04	1.00E-03	1.34E-08	112	90	80.2	0.891
1	VL_N030Q	379.1	1.20E+05	1.05E-03	8.71E-09	155.4	143.8	126.9	0.882

Figura 9

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ans)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tarde	unión tar/ unión temp
1	VL_Y031W	343.9	1.84E+05	8.74E-03	4.75E-08	145.1	126.2	48.6	0.385
1	VL_G050L	400.4	5.95E+04	8.12E-04	1.37E-08	126.1	93	84.8	0.912
1	VL_G050D	383	1.50E+05	4.97E-04	3.30E-09	169.8	164.3	154	0.937
1	VL_G050Y	368.2	8.91E+04	8.58E-04	9.62E-09	136.8	117.8	106.4	0.903
1	VL_K051A	358.7	1.48E+05	1.40E-04	9.42E-10	161.6	157	153.1	0.975
1	VL_K051L	391.7	1.40E+05	1.21E-04	8.65E-10	174.7	168.9	165.2	0.978
1	VL_K051Q	361.2	1.43E+05	1.47E-04	1.03E-09	162.8	157.3	151.3	0.975
1	VL_K051Y	312.9	1.34E+05	1.51E-04	1.12E-09	138.8	132.7	129.5	0.976
1	VL_K051S	415.3	7.08E+04	2.25E-04	3.18E-09	163.9	132.4	128.6	0.971
1	VL_K051W	447.3	1.26E+05	1.73E-04	1.38E-09	190.8	182.1	177.3	0.974
1	VL_N052A	320.3	1.34E+05	1.76E-04	1.31E-09	140.3	134.3	130.6	0.972
1	VL_N052Q	430.2	1.27E+05	1.67E-04	1.31E-09	184.9	176.8	172.2	0.974

2	VH_G026A	268.4	1.46E+05	1.85E-04	1.26E-09	107.8	104.7	101.4	0.968
2	VH_G026K	360	1.30E+05	1.78E-04	1.36E-09	145.1	139.5	135.3	0.970
2	VH_G026W	354.4	1.34E+05	1.60E-04	1.19E-09	144.8	140	136	0.971
2	VH_G026S	341.3	1.41E+05	1.66E-04	1.18E-09	143.6	139.4	135.3	0.971

Figura 10

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
2	VH_G026L	356.7	1.43E+05	1.66E-04	1.16E-09	150.7	147.2	142.8	0.970
2	VH_G026D	363.9	1.47E+05	1.88E-04	1.28E-09	155.9	152.8	148	0.969
2	VH_G026Y	341.7	1.38E+05	1.78E-04	1.30E-09	142.1	137.2	133.1	0.970
2	VH_G026H	386.6	1.36E+05	1.85E-04	1.36E-09	160.4	155.9	151.1	0.969
2	VH_G027K	366.2	1.30E+05	1.79E-04	1.38E-09	147.4	141.7	137.3	0.969
2	VH_G027Q	318.7	1.42E+05	1.96E-04	1.38E-09	135.6	131.2	126.9	0.967
2	VH_G027W	303.4	1.38E+05	1.90E-04	1.38E-09	126.8	121.8	117.8	0.967
2	VH_G027S	371.6	1.38E+05	1.77E-04	1.28E-09	154.9	150.6	146.1	0.969
2	VH_G027L	348.8	1.47E+05	1.67E-04	1.14E-09	149.5	145.7	141.3	0.970
2	VH_G027D	314.6	1.44E+05	2.23E-04	1.55E-09	137.2	132.4	127.8	0.965
2	VH_G027V	391.9	1.38E+05	1.82E-04	1.32E-09	164.8	160.3	155.5	0.970
2	VH_G027H	368.6	1.42E+05	1.88E-04	1.33E-09	156.3	152.4	147.6	0.969
2	VH_S028A	373.7	1.42E+05	1.63E-04	1.15E-09	158.8	155	150.5	0.971
2	VH_S028L	336.4	1.41E+05	1.85E-04	1.31E-09	142.9	137.9	133.6	0.969
2	VH_S028Y	342.1	1.39E+05	1.67E-04	1.20E-09	143.7	138.5	134.4	0.970
2	VH_S028W	341.9	1.34E+05	1.95E-04	1.46E-09	141.5	135.6	131.3	0.968
2	VH_S028H	310.9	1.39E+05	1.74E-04	1.25E-09	131.7	126.9	123.1	0.970

Figura 11

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ta (1/MeS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
2	VH_5028K	385.6	1.25E+05	1.75E-04	1.40E-09	154.2	147.9	143.6	0.971
2	VH_5029A	368.5	1.38E+05	2.26E-04	1.64E-09	154.2	150.1	144.8	0.965
2	VH_5029K	319.9	1.27E+05	2.42E-04	1.91E-09	123.3	116.8	112.4	0.962
2	VH_5029Q	338.6	1.37E+05	2.24E-04	1.64E-09	140.5	135.9	131.2	0.965
2	VH_5029W	321.1	1.35E+05	2.26E-04	1.68E-09	131.8	125.7	121.4	0.966
2	VH_5029L	371.5	1.42E+05	1.56E-04	1.10E-09	158	153.5	149.1	0.971
2	VH_5029H	351.4	1.33E+05	2.41E-04	1.82E-09	143.5	137	132	0.964
2	VH_5030A	310.2	1.43E+05	1.56E-04	1.09E-09	133.3	128.5	124.9	0.972
2	VH_5030L	328.8	1.34E+05	1.88E-04	1.40E-09	139.3	133.4	129.3	0.969
2	VH_5030D	362.3	1.45E+05	1.88E-04	1.30E-09	159	154.4	149.6	0.969
2	VH_5030Y	358	1.29E+05	1.86E-04	1.44E-09	149.2	142.6	138.3	0.970
2	VH_5030Q	367	1.41E+05	1.39E-04	9.81E-10	157.2	152.4	148.4	0.974
2	VH_5030W	376.4	1.32E+05	1.78E-04	1.33E-09	155.5	149.6	145.1	0.970
2	VH_5030H	380.5	1.41E+05	1.51E-04	1.07E-09	160.7	155.9	151.6	0.972
2	VH_5030K	343.5	1.24E+05	1.61E-04	1.30E-09	136.7	129.7	126	0.971
2	VH_5031A	349.6	1.39E+05	1.78E-04	1.28E-09	148.6	143.4	139.1	0.970
2	VH_5031L	351.2	1.32E+05	1.96E-04	1.48E-09	148.3	142	137.6	0.969

Figura 12

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/14s)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
2	VH_S031D	363.4	1.37E+05	2.79E-04	2.03E-09	158.3	152.6	146.5	0.960
2	VH_S031V	371.5	1.39E+05	2.22E-04	1.64E-09	155.9	150.3	145.1	0.965
2	VH_S031Q	334.2	1.40E+05	1.78E-04	1.27E-09	142.5	137.3	133.2	0.970
2	VH_S031W	355.8	1.27E+05	1.75E-04	1.37E-09	142	135.3	131.2	0.970
2	VH_S031H	356.4	1.37E+05	1.95E-04	1.43E-09	150	144.5	139.8	0.967
2	VH_S031K	380.3	1.30E+05	2.73E-04	2.10E-09	156.7	150.7	144.8	0.961
2	VH_S032A	332.3	1.38E+05	1.36E-04	9.87E-10	140.6	135.6	132.2	0.975
2	VH_S032L	366.7	1.30E+05	1.54E-03	1.19E-08	149.7	139.7	116.8	0.836
2	VH_S032D	364.2	1.07E+05	2.77E-03	2.60E-08	149.3	129.9	95.4	0.734
2	VH_S032Y	313.6	1.39E+05	6.63E-04	4.77E-09	130.1	124.3	114.1	0.918
2	VH_S032Q	545.7	1.32E+05	2.52E-04	1.92E-09	224.6	216.9	208.9	0.963
2	VH_S032W	371.9	1.24E+05	3.25E-04	2.63E-09	144.5	137	130.7	0.954
2	VH_S032H	339.4	1.33E+05	5.55E-04	4.24E-09	141.1	133.6	124.1	0.929
2	VH_S032K	386.6	1.17E+05	8.48E-04	7.24E-09	148.9	138.3	124.8	0.902
2	VH_N033A	355.8	1.21E+05	2.63E-04	2.16E-09	146.2	138.5	133.3	0.962
2	VH_N033K	302.3	1.02E+05	2.65E-04	2.60E-09	116.1	105.8	101.6	0.960
2	VH_N033Q	365.1	1.38E+05	1.65E-04	1.19E-09	156.1	152.1	147.8	0.971

Figura 13

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tarde	unión tar/ unión temp
2	VH_W033W	381.1	1.31E+05	3.48E-04	2.65E-09	156.5	150.9	143.6	0.952
2	VH_W033S	321.5	1.28E+05	2.41E-04	1.88E-09	134.1	128	123.3	0.963
2	VH_W033L	344	1.29E+05	2.02E-04	1.56E-09	140.6	134.3	129.8	0.966
2	VH_W033D	372.7	1.03E+05	1.25E-03	1.21E-08	148.2	133	115.2	0.866
2	VH_W033Y	377.8	1.38E+05	2.11E-04	1.53E-09	160.5	155.8	150.5	0.966
2	VH_W033H	358.6	1.40E+05	1.41E-04	1.01E-09	153.3	148.6	144.6	0.973
2	VH_W033A	397.2	1.22E+05	2.68E-03	2.20E-08	164.1	148.8	110.1	0.740
2	VH_W034Q	378	1.25E+05	1.90E-03	1.51E-08	153.7	142.4	114.8	0.806
2	Parent clone	361.4	1.41E+05	1.38E-04	9.82E-10	156.5	151.9	147.9	0.974
2	VH_W034S	446	9.21E+04	2.79E-03	3.03E-08	171.1	143.5	105.4	0.734
2	VH_W034L	335.3	1.33E+05	1.17E-03	8.85E-09	140.8	132.4	115.2	0.870
2	VH_W034D	344.6	1.31E+05	3.31E-03	2.53E-08	150	134.3	92.4	0.688
2	VH_W034H	366.3	1.04E+05	2.61E-03	7.51E-08	139.5	121.5	90.7	0.747
2	VH_W035A	23.7	1.04E+05	6.49E-04	6.21E-09	10.6	9.1	8.4	0.923
2	VH_W035K	20.7	9.20E+04	6.04E-04	6.56E-09	12.4	10.5	9.7	0.924
2	VH_W035Q	76.3	9.37E+04	3.20E-04	3.45E-09	31.1	27.7	26.5	0.957
2	VH_W035V	327.9	1.38E+05	1.77E-04	1.29E-09	140.7	135.8	131.7	0.970

Figura 14

corrida #	sustitución aminoácido	nivel capture	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
2	VH_I029S	334.2	1.39E+05	2.40E-04	1.73E-09	143.3	138.2	133.1	0.963
2	VH_I029D	343.6	1.43E+05	2.52E-04	1.77E-09	152.5	147.5	142.1	0.963
2	VH_I029Y	362.8	1.32E+05	2.09E-04	1.58E-09	159.8	153.7	148.6	0.967
2	VH_W034K	325.8	3.25E+05	4.06E-02	1.25E-07	68.4	48.4	10.8	0.223
2	VL_R091D	1.9	1.05E+05	6.94E-04	6.64E-09	9.3	8.2	7.5	0.915
2	VH_E050S	348.9	1.56E+05	1.86E-03	1.19E-08	155.4	147.7	118.9	0.805
2	VH_E050L	376.3	1.16E+05	7.91E-03	6.81E-08	132.2	105.4	44.2	0.419
2	VH_E050D	367.4	1.35E+05	3.40E-03	2.52E-08	156.5	141.5	96.5	0.682
2	VH_E050Y	379.9	1.07E+05	5.24E-03	4.89E-08	135.7	112.8	63.4	0.562
2	VH_E050H	352.9	1.46E+05	1.02E-03	7.01E-09	152.6	146.2	129	0.882
2	VH_I051A	361.3	1.45E+05	1.84E-04	1.27E-09	158.6	153.9	149.2	0.969
2	VH_I051K	359.9	1.16E+05	3.26E-04	2.81E-09	141.5	132.1	126.2	0.955
2	VH_I051Y	388.4	1.32E+05	1.73E-04	1.32E-09	163.7	156.6	152.1	0.971
2	VL_P055Q	370.6	1.35E+05	1.72E-04	1.27E-09	161.8	155.4	150.9	0.971
2	VL_R054D	377.5	8.42E+04	2.07E-04	2.46E-09	97.6	84.4	81.7	0.968
2	VH_P100Y	350.1	6.91E+04	5.89E-04	8.52E-09	120.7	95.5	89.1	0.933
2	VH_S100aD	393.8	9.83E+04	3.07E-06	3.12E-11	10.1	9.6	9.5	0.990

Figura 15

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
2	VL_S090W	386.1	1.27E+05	4.87E-04	3.84E-09	10.3	10.4	9.9	0.952
2	VL_N089H	400.3	1.40E+05	5.11E-04	3.64E-09	175.2	168.7	157.9	0.936
2	VL_P055H	378.3	1.38E+05	1.44E-04	1.04E-09	164.8	159.7	155.6	0.974
2	VH_Y102A	407.7	1.36E+05	1.20E-04	8.80E-10	173.1	167.7	163.7	0.976
2	VL_N053Y	387.3	1.14E+05	3.56E-04	3.13E-09	157.5	146.8	139.9	0.953
2	VL_S056A	335.5	1.44E+05	1.51E-04	1.05E-09	148.9	144.8	140.8	0.972
2	VL_S056Q	360.8	1.41E+05	1.53E-04	1.09E-09	158.9	153.9	149.8	0.973
3	VH_I097K	479.1	1.38E+05	2.35E-04	1.70E-09	190.3	184.2	173.2	0.940
3	VH_I097S	640.8	1.32E+05	9.43E-04	7.15E-09	259.8	247.3	198.1	0.801
3	VH_I097L	572.5	1.40E+05	3.00E-04	2.15E-09	237.1	229.6	212.9	0.927
3	VH_I097D	585	1.55E+05	4.70E-03	3.04E-08	211.8	192.9	76.3	0.396
3	VH_I097V	541.7	9.89E+04	2.27E-04	2.29E-09	206.5	186.9	176.6	0.945
3	VH_I097H	559.9	1.22E+05	1.46E-04	1.19E-09	218.6	207.7	199.5	0.961
3	VH_G098K	514	7.22E+04	1.69E-07	2.35E-12	5.7	6.2	7.5	1.210
3	VH_G098W	582.4	1.09E+05	4.29E-07	3.94E-12	4.8	6.5	6.6	1.015
3	VH_G098S	552.6	2.15E+05	3.20E-02	1.48E-07	168.6	111.8	6.6	0.059

Figura 16

conida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Me)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
3	VH_G098D	766.5	1.12E+05	4.84E-02	4.30E-07	153.7	59.5	9.9	0.166
3	VH_G098Y	622.4	7.45E+04	6.00E-09	8.06E-14	5.7	5.9	7	1.186
3	VH_W099A	544.2	9.58E+04	2.74E-07	2.85E-12	5.1	5.9	6.6	1.119
3	VH_W099K	583.7	6.75E+04	9.48E-08	1.40E-12	6	5.4	7	1.296
3	VH_W099Q	564.8	1.65E+05	2.81E-04	1.71E-09	6.4	9.6	8.1	0.844
3	VH_W099Y	610.4	2.12E+05	1.91E-02	9.02E-08	208.5	161.4	13.9	0.086
3	VH_W099S	693.4	1.54E+05	2.69E-07	1.75E-12	5.9	7.4	7.9	1.068
3	VH_W099D	579.5	6.93E+04	3.51E-07	5.08E-12	4.9	5	5.7	1.140
3	VH_W099H	664.4	2.88E+05	3.94E-02	1.37E-07	207.8	139.4	8.4	0.060
3	VH_P100A	600.8	4.80E+05	9.74E-02	2.03E-07	129.4	76.1	7	0.092
3	VH_P100K	532.7	1.00E+05	7.84E-04	7.84E-09	6.1	10.4	7.1	0.683
3	VH_P100Q	638.1	1.47E+05	2.22E-06	1.50E-11	5.5	8.5	7.9	0.929
3	VH_P100W	744.8	9.12E+04	8.95E-07	9.81E-12	6	7.2	8.5	1.181
3	VH_P100S	520.8	7.99E+05	1.93E-01	2.42E-07	109.9	58.3	6.2	0.106
3	VH_P100L	912.7	1.26E+05	2.13E-06	1.69E-11	6.7	10.6	9.9	0.934
3	VH_P100D	679.9	7.17E+04	2.92E-07	4.07E-12	4.8	5.3	6.2	1.170
3	VH_P100H	736.3	1.48E+05	1.32E-04	8.91E-10	15.5	18.5	17.1	0.924

Figura 17

confida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
3	VH_S100aA	655.9	1.16E+05	2.22E-04	1.92E-09	266.8	250.7	236.9	0.945
3	VH_S100aL	617.3	1.27E+05	7.29E-04	5.75E-09	253.9	240.5	202.3	0.841
3	VH_S100aQ	667.6	1.41E+05	1.77E-04	1.25E-09	282.2	274.5	261.8	0.954
3	VH_S100aW	616.1	1.10E+05	5.59E-04	5.08E-09	243.2	224.7	196.7	0.875
3	VH_S100aH	647.1	1.46E+05	2.06E-04	1.41E-09	281.3	274.2	259.9	0.948
3	VH_S100aK	799.8	3.10E+05	4.10E-02	1.32E-07	234.4	159.1	10.3	0.065
3	VH_F100bA	330.8	8.97E+04	4.80E-04	5.34E-09	123.2	107.5	96.2	0.895
3	VH_F100bK	-2.9	9.43E+04	4.28E-03	4.54E-08	5	5	2.2	0.440
3	VH_F100bQ	283.7	7.88E+04	5.62E-04	7.13E-09	102.3	85	74.7	0.879
3	VH_F100bW	14.1	4.24E+05	6.96E-03	1.64E-08	8.8	7.5	2.7	0.360
3	VH_F100bS	355.8	9.81E+04	3.85E-04	3.92E-09	145.3	129.4	118.4	0.915
3	VH_F100bL	744.1	1.51E+05	3.80E-04	2.10E-09	360.2	355.3	325.5	0.916
3	VH_F100bD	-9.8	8.83E+04	1.34E-02	1.51E-07	6.5	4.6	0	0.000
3	VH_F100bH	-0.8	6.00E+04	1.21E-02	2.02E-07	7.2	4.3	0	0.000
3	VH_D101A	140.8	1.46E+05	4.56E-04	3.13E-09	69.4	68	60.8	0.894
3	VH_D101L	-0.6	7.58E+04	1.47E-02	1.94E-07	6	4	-0.2	-0.050
3	VH_D101Q	735.8	1.83E+05	2.54E-04	1.39E-09	343.1	337.8	319	0.944

Figura 18

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
3	VH_D101S	-2	1.57E+05	5.89E-03	3.78E-08	4.6	5.2	1.8	0.346
3	VH_D101W	245.1	1.51E+05	4.03E-04	2.67E-09	109.9	107.2	97.6	0.910
3	VH_D101H	534.2	2.09E+05	4.27E-04	2.04E-09	259	255.1	232.6	0.912
3	VH_D101K	698.6	2.13E+05	4.12E-04	1.93E-09	321.1	315.4	289.4	0.918
3	VH_Y102K	899.4	2.73E+05	2.21E-04	8.08E-10	450.8	451.8	430.5	0.953
3	VH_Y102Q	763.5	3.30E+05	2.37E-04	7.17E-10	394.6	396.2	376.4	0.950
3	VH_Y102W	660.2	3.28E+05	2.43E-04	7.46E-10	346.9	348.4	330.1	0.947
3	VH_Y102L	778.2	1.33E+05	1.56E-04	1.17E-09	328.1	316.4	301.2	0.938
3	VH_Y102D	339.3	1.51E+05	2.60E-04	1.72E-09	146.5	143.6	134.2	0.935
3	VH_Y102H	720	1.37E+05	1.62E-04	1.19E-09	308.2	288.4	285.7	0.957
3	VH_E095A	819.8	9.76E+04	4.61E-04	4.72E-09	298.7	269.4	241	0.895
3	VH_E095K	621.7	5.79E+10	2.61E+02	4.51E-09	12.5	19.9	11.2	0.563
3	VH_E095Q	0.5	9.82E+04	4.84E-03	4.93E-08	5	4.1	1.1	0.268
3	VH_E095W	735.9	1.09E+05	5.16E-10	4.71E-15	7.6	8.4	10.4	1.138
3	VH_E095S	158	1.13E+05	8.78E-04	7.78E-09	67.4	62.1	50.2	0.808
3	VH_E095L	878.7	9.70E+04	6.37E-04	6.57E-09	314.3	281.6	241.9	0.859
3	VH_E095D	776.9	8.75E+04	9.77E-04	1.12E-08	259.2	224.6	178.5	0.795

Figura 19

conida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/AdA)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
3	VH_E09SY	23.9	1.10E+03	1.31E-03	1.19E-08	15	14.3	10.6	0.741
3	VH_E09SH	694.5	9.06E+04	8.47E-04	9.34E-09	244.1	213.6	175.2	0.820
3	VH_G096A	599	1.05E+05	9.02E-04	8.51E-08	250.1	227.6	184.5	0.811
3	VH_G096K	-1	5.54E+05	8.41E-03	1.52E-08	5	5	2.4	0.480
3	VH_G096Q	609.8	9.98E+04	1.53E-03	1.53E-08	244.5	216.7	152.9	0.706
3	VH_G096W	-2.7	4.37E+05	5.74E-03	1.32E-08	5.4	5.9	3.6	0.610
3	VH_G096S	939.9	1.01E+05	1.07E-03	1.06E-08	382.2	341.9	267.2	0.782
3	VH_G096L	807.4	3.47E+05	4.78E-02	1.38E-07	204.8	140.5	13	0.093
4	VL_S090A	399.4	1.21E+05	2.03E-04	1.68E-09	158.7	149.1	141.2	0.947
4	VL_S090L	382.7	9.53E+04	3.82E-03	4.01E-08	88.6	64.7	34.7	0.596
4	VL_S090D	388.3	9.69E+04	5.99E-03	6.19E-08	126.7	95.9	31.1	0.324
4	VL_S090Y	379.9	7.60E+08	1.15E+02	1.51E-07	37.4	26.4	4.5	0.170
4	VL_S090Q	395.2	1.83E+09	1.40E+02	7.65E-08	20.4	18.3	3.7	0.202
4	VL_S090H	383.2	1.56E+10	2.44E+02	1.56E-08	7.6	9.8	4.3	0.439
4	VL_R091A	421.8	7.22E+04	1.96E-03	2.72E-08	75.7	59.6	37.8	0.634
4	VL_R091K	404.1	1.74E+05	1.59E-02	9.14E-08	142.7	108.8	8.3	0.076

Figura 20

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
4	VL_R091Q	400.5	8.98E+07	2.00E+01	2.23E-07	72.7	38.2	4.4	0.115
4	VL_R091W	397.9	7.93E+04	4.22E-04	5.33E-09	4.4	5.1	4.4	0.863
4	VL_R091L	398.6	8.23E+04	3.12E-04	3.79E-09	4.7	5.2	4.7	0.904
4	VL_R091Y	408.2	1.24E+05	8.09E-04	6.52E-09	4.9	5.1	4.1	0.804
4	VL_R091H	388.3	1.40E+05	5.41E-02	3.87E-07	85	33.2	5.1	0.154
4	VL_D092A	404.3	7.79E+04	3.30E-04	4.24E-09	137.4	114.5	105.6	0.922
4	VL_D092L	393.1	1.85E+05	2.60E-02	1.41E-07	101.3	68.3	5.6	0.082
4	VL_D092Q	382.2	8.07E+04	2.18E-03	2.70E-08	126.2	102.3	62.7	0.613
4	VL_D092Y	380.6	1.15E+05	1.09E-02	9.41E-08	99.1	71.6	14.6	0.204
4	VL_D092S	384.7	1.09E+05	2.35E-04	2.15E-09	148.3	137.9	129.7	0.943
4	VL_D092W	380.4	8.75E+04	2.35E-03	2.68E-08	117.8	95.5	58.7	0.615
4	VL_D092H	380.3	6.82E+04	9.91E-04	1.45E-08	125	98.8	78.6	0.796
4	VL_D092K	396.8	9.43E+04	6.91E-03	7.32E-08	99.2	69.6	22.2	0.319
4	VL_S093A	390.7	1.32E+05	2.29E-04	1.74E-09	162.9	156.4	147.3	0.942
4	VL_S093L	405.5	1.47E+05	1.58E-04	1.08E-09	173.5	169	161.7	0.957
4	VL_S093D	399	1.33E+05	2.62E-04	1.98E-09	167.8	160.9	150.4	0.935
4	VL_S093Y	411.3	1.39E+05	1.72E-04	1.24E-09	171.9	165.9	158.2	0.954

Figura 21

cantidad #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Mts)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
4	VL_S093Q	388.9	1.35E+05	2.17E-04	1.61E-09	163.7	158.3	149.5	0.944
4	VL_S093W	413	1.40E+05	1.65E-04	1.18E-09	171.6	166	158.4	0.954
4	VL_S093H	388.9	1.26E+05	2.26E-04	1.79E-09	159.1	152.3	143.6	0.943
4	VL_S093K	396	1.15E+05	2.03E-04	1.77E-09	156.2	146	138.3	0.947
4	VL_S094A	411.6	1.27E+05	2.42E-04	1.91E-09	169	160.4	150.6	0.939
4	VL_S094L	395.2	1.37E+05	2.33E-04	1.70E-09	167.4	162	152.5	0.941
4	VL_S094D	404.5	1.31E+05	2.73E-04	2.08E-09	171	164	153	0.933
4	VL_S094K	409	1.29E+05	2.66E-04	2.07E-09	167.8	160.1	149.6	0.934
4	VL_S094Q	390.5	1.27E+05	2.05E-04	1.62E-09	158.6	150.6	142.7	0.948
4	VL_S094W	418.1	1.35E+05	2.59E-04	1.93E-09	172.5	165.4	154.5	0.934
4	VL_S094H	416.6	1.15E+05	2.50E-04	2.17E-09	164.2	153.2	143.7	0.938
4	VL_S094K	387.2	1.02E+05	2.73E-04	2.68E-09	146.8	134.1	125.1	0.933
4	VL_G095A	396.5	1.17E+05	1.45E-03	1.24E-08	156.5	144.3	103.1	0.714
4	VL_G095K	399.5	1.53E+05	2.34E-03	1.53E-08	8.8	13.8	6.4	0.464
4	VL_G095Q	406.1	1.45E+05	1.18E-02	8.13E-08	25.2	29.7	6.9	0.232
4	VL_G095W	419.5	1.94E+05	5.16E-02	2.66E-07	83.4	39.2	7	0.179
4	VL_G095S	405.3	1.99E+05	1.84E-02	9.23E-08	128.1	98.5	10.3	0.105

Figura 22

comida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (J/Me)	kd (J/s)	KD (M)	amax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
4	VL_K09SaD	408.9	1.68E+05	6.66E-03	3.96E-08	171.9	153.7	39.1	0.254
4	VL_G09SL	390.8	1.23E+05	2.37E-02	1.92E-07	113.2	71.1	6.7	0.094
4	VL_G09SD	400.3	1.45E+05	3.91E-02	2.70E-07	96.7	49.5	7.1	0.143
4	VL_G09SY	404.5	6.00E+05	9.08E-02	1.51E-07	115.8	71.9	7	0.097
4	VL_G09SH	403.3	2.16E+05	2.87E-03	1.33E-08	11.3	18.9	8.6	0.455
4	VL_K09SaD	404.9	1.42E+05	4.49E-04	3.17E-09	176.5	171	153.2	0.896
4	VL_K09SaL	408.7	1.38E+05	3.36E-04	2.43E-09	177.3	171.4	157.5	0.919
4	VL_K09SaQ	406.1	1.49E+05	3.21E-04	2.16E-09	179.2	174.8	161.2	0.922
4	VL_K09SaV	438.6	1.35E+05	4.46E-04	3.30E-09	184.6	176.5	158.1	0.886
4	VL_K09SaS	410.9	1.41E+05	3.98E-04	2.83E-09	178.2	173	156.7	0.906
4	VL_K09SaW	431.4	1.31E+05	1.20E-03	9.11E-09	174.9	164.8	124.1	0.753
4	VL_N09SbA	413.5	1.43E+05	2.05E-04	1.43E-09	176.8	172.1	162.8	0.946
4	VL_N09SbK	408.6	1.27E+05	1.84E-04	1.45E-09	168.1	160.6	152.7	0.951
4	VL_N09SbQ	403	1.36E+05	2.29E-04	1.67E-09	170.1	165	155.3	0.941
4	VL_N09SbW	397	1.45E+05	1.91E-04	1.31E-09	170.9	167.3	158.8	0.949
4	VL_N09SbS	423.4	1.42E+05	1.92E-04	1.33E-09	181.1	175.7	166.7	0.949
4	VL_N09SbL	418.8	1.37E+05	1.97E-04	1.44E-09	177.5	171.6	162.6	0.948

Figura 23

córida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ma)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
4	VL_N095BD	424.5	1.48E+05	2.81E-04	1.90E-09	185.8	180.7	168	0.930
4	VL_N095bY	424.2	1.31E+05	2.87E-04	2.18E-09	170.2	163	151.3	0.928
4	VL_N095bH	395.5	1.40E+05	1.97E-04	1.40E-09	169.2	164.8	156.3	0.948
4	VL_L096A	407.8	1.13E+05	4.70E-04	4.14E-09	161.5	150.8	134.4	0.891
4	VL_L096K	403.1	1.22E+06	1.75E-01	1.02E-07	88.7	67.8	10.2	0.150
4	VL_L096Q	409.3	1.15E+05	2.16E-04	1.88E-09	161.7	152.4	144	0.945
4	VL_L096Y	416.2	1.18E+05	1.32E-03	1.11E-08	171.4	158.9	117	0.736
4	VL_L096S	419.5	1.09E+05	3.84E-04	3.34E-09	163.1	151.1	137.9	0.913
4	VL_L096W	410.5	1.27E+05	2.88E-03	2.27E-08	166.1	152.6	79.5	0.521
4	VL_L096D	-2.8	8.50E+04	1.28E-03	1.51E-08	7.5	6.5	4.6	0.708
4	VL_L096H	410.3	1.26E+05	1.69E-04	1.34E-09	173.8	166.5	159	0.955
4	VL_V097A	408.9	1.36E+05	2.30E-04	1.69E-09	174.3	169.1	159.1	0.941
4	VL_V097K	426.9	1.01E+05	4.58E-04	4.54E-09	163.4	147.6	132	0.894
4	VL_V097Q	427.8	1.24E+05	3.45E-04	2.79E-09	175.9	166.6	152.8	0.917
4	VL_V097W	416.4	1.06E+05	9.69E-04	9.18E-09	163.2	148.6	118.5	0.797
4	VL_V097L	421.7	1.19E+05	4.81E-04	4.03E-09	172.4	162.5	144.5	0.889
4	VL_V097D	440	1.44E+05	2.45E-04	1.71E-09	190.4	185.1	173.5	0.937

Figura 24

corrida #	sustitución aminoácido	nivel capture	ka [1/MS]	kd [1/s]	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
4	VL_V097Y	427.1	8.66E+04	7.91E-04	9.13E-09	158.5	136	112.9	0.830
4	VL_V097H	440.1	1.07E+05	4.14E-04	3.87E-09	174.5	159.9	144.5	0.904
4	VL_N089A	420	9.54E+04	6.32E-04	6.62E-09	57.7	52.5	44.9	0.855
4	VL_N089K	450.3	8.69E+04	1.09E-03	1.26E-08	154.6	132.1	102.4	0.775
4	VL_N089Q	446.1	1.22E+05	5.22E-04	4.27E-09	184.9	174.1	153.4	0.881
4	VL_N089W	419.9	9.00E+04	6.41E-03	7.12E-08	115.9	82	28.6	0.349
4	VL_N089S	408.9	1.34E+05	2.05E-04	1.53E-09	174.7	169	160	0.947
4	VL_N089L	425.2	1.49E+05	2.02E-04	1.36E-09	186.4	182.5	172.7	0.946
4	VL_N089D	458.8	5.19E+04	5.50E-04	1.06E-08	144.6	101.1	88.7	0.877
4	VL_N089Y	435.4	1.21E+05	8.81E-04	7.28E-09	168.5	157.2	127.4	0.810
4	VL_S090K	411.5	8.16E+04	1.03E-07	1.27E-12	7.7	7.8	8	1.026
4	VL_K095aH	447.6	1.32E+05	4.73E-04	3.59E-09	190.2	181.6	161.8	0.891
4	Parent clone	447	1.42E+05	1.82E-04	1.28E-09	193.4	188	178.9	0.952
4	VL_K051W	489.9	1.28E+05	2.16E-04	1.69E-09	207.5	198.1	187.2	0.945
4	VL_N052Q	434.8	1.26E+05	2.01E-04	1.59E-09	184.6	176.5	167.3	0.948
5	VH_W034V	477.5	1.55E+05	5.98E-04	3.87E-09	198.1	191.4	165.8	0.866

Figura 25

comida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
5	VH_G026Q	489.2	1.67E+05	1.77E-04	1.06E-09	213.7	210	200.6	0.955
5	VH_S035aL	504.6	8.75E+04	5.54E-04	6.33E-09	159.3	136.9	120.1	0.877
5	VH_G027A	439.9	1.68E+05	1.63E-04	9.70E-10	192.2	189.3	181.4	0.958
5	VH_S028D	520.7	1.68E+05	1.94E-04	1.15E-09	232.6	227.9	217	0.952
5	VH_S028Q	482.1	1.67E+05	1.82E-04	1.09E-09	212.9	209.5	199.9	0.954
5	VH_I051Q	508.6	1.48E+05	1.91E-04	1.29E-09	205.4	198.8	189.2	0.952
5	VH_I051W	494.9	1.50E+05	2.35E-04	1.57E-09	205.8	199.7	188.3	0.943
5	VH_I051S	477.1	1.63E+05	2.03E-04	1.24E-09	206.2	202.4	192.2	0.950
5	VH_I051L	489.8	1.70E+05	1.70E-04	1.00E-09	211.1	207.8	198.8	0.957
5	VH_I051D	51.2	1.52E+05	5.21E-04	3.43E-09	39.5	17.9	15.8	0.883
5	VH_N060H	497	1.72E+05	1.54E-04	8.94E-10	220	217.1	208.4	0.960
5	VH_I051H	366.2	1.59E+05	2.26E-04	1.42E-09	153.1	149.2	140.9	0.944
5	VH_Y052A	495.6	1.42E+05	8.84E-04	6.22E-09	212.5	202.4	164.5	0.813
5	VH_Y052K	475.6	1.27E+05	1.51E-03	1.19E-08	187.4	174.3	122.9	0.705
5	VH_Y052Q	460.9	1.38E+05	8.48E-04	6.13E-09	196.5	186.9	153.3	0.820
5	VH_Y052W	484.1	1.58E+05	1.36E-04	8.13E-10	210.2	207.1	199.7	0.964
5	VH_Y052S	484.1	1.43E+05	9.42E-04	6.60E-09	209.1	199.5	160	0.802

Figura 26

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
5	VH_Y052L	512.7	1.54E+05	1.46E-04	9.47E-10	221.9	216.3	208.1	0.962
5	VH_Y052D	526.4	1.47E+05	6.08E-04	4.13E-09	234.6	225.3	195	0.866
5	VH_Y052H	508.9	1.57E+05	2.59E-04	1.64E-09	219.7	214.5	201.1	0.938
5	VH_H053A	528.2	1.52E+05	2.39E-04	1.57E-09	224.6	218.1	205.4	0.942
5	VH_H053L	511.9	1.51E+05	2.80E-04	1.85E-09	217.3	211.1	197	0.933
5	VH_H053Q	507.3	1.61E+05	2.00E-04	1.24E-09	220.6	216.3	205.5	0.950
5	VH_H053V	518.6	1.60E+05	1.68E-04	1.05E-09	224.4	219.4	210	0.957
5	VH_H053S	519.4	1.56E+05	2.23E-04	1.43E-09	223.8	217.9	205.9	0.945
5	VH_H053W	529.4	1.62E+05	1.68E-04	1.04E-09	230.2	225.6	215.9	0.957
5	VH_H053D	549.6	1.42E+05	3.73E-04	2.63E-09	238.4	228.7	209	0.914
5	VH_H053K	505.8	1.55E+05	1.66E-04	1.07E-09	210.4	205.7	196.8	0.957
5	VH_S054A	539.2	1.68E+05	1.38E-04	8.22E-10	238.3	234.5	226	0.964
5	VH_S054L	515.3	1.68E+05	1.49E-04	8.89E-10	226.1	222.6	214	0.961
5	VH_S054D	489.1	1.43E+05	3.00E-04	2.10E-09	214.6	206.8	192.2	0.929
5	VH_S054Y	560.7	2.24E+05	1.38E-04	6.17E-10	249	248.9	239.7	0.963
5	VH_S054Q	531.1	1.73E+05	1.67E-04	9.70E-10	234.8	231.5	221.5	0.957
5	VH_S054W	532.2	2.69E+05	1.36E-04	5.06E-10	249.8	251	241.7	0.963

Figura 27

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)	R _{max} (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
5	VH_S054H	549.4	1.91E+05	1.43E-04	7.57E-10	248.7	246.5	237.1	0.962
5	VH_S054K	518.7	1.58E+05	3.20E-04	2.03E-09	218.3	213.6	197.2	0.923
5	VH_G055A	548.7	1.68E+05	1.53E-04	9.15E-10	242.6	238.4	228.9	0.960
5	VH_G055K	536.2	1.45E+05	1.63E-04	1.14E-09	222.4	216	206.8	0.957
5	VH_G055Q	544.4	1.64E+05	1.61E-04	9.79E-10	238.8	234.4	224.7	0.959
5	VH_G055W	555.2	1.56E+05	1.81E-04	1.16E-09	234.6	229.1	218.5	0.954
5	VH_G055S	535	1.68E+05	1.58E-04	9.52E-10	235.4	231.3	222	0.960
5	VH_G055L	550	1.62E+05	1.53E-04	9.45E-10	240.3	235.6	226.2	0.960
5	VH_G055D	2.8	1.23E-02	1.74E-03	1.41E-01	0.1	-1	-0.6	0.600
5	VH_G055Y	531	1.60E+05	1.60E-04	1.00E-09	229.1	224.8	215.6	0.959
5	VH_G055H	556.9	1.60E+05	1.53E-04	9.59E-10	242.1	237.3	228	0.961
5	VH_N056A	587.1	1.59E+05	2.04E-04	1.28E-09	255.6	249.9	237.2	0.949
5	VH_N056K	583.3	1.39E+05	5.09E-04	3.67E-09	232.2	222.5	196.9	0.885
5	VH_N056Q	528.2	1.58E+05	1.97E-04	1.25E-09	231.2	226.5	215.3	0.951
5	VH_N056W	551.6	2.16E+05	1.42E-04	6.59E-10	253	253	243.5	0.962
5	VH_N056S	578.6	1.62E+05	2.31E-04	1.42E-09	254.7	249.4	235.4	0.944
5	VH_N056L	562.5	1.80E+05	1.53E-04	8.49E-10	252.4	249.7	239.8	0.960

Figura 28

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Me)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temperana	unión tarde/a	unión tar/ unión temp
5	VH_N056D	547.5	1.55E+05	1.41E-04	9.11E-10	245.3	239.6	230.9	0.964
5	VH_N056Y	566.6	1.85E+05	1.44E-04	7.78E-10	255.2	253.6	244	0.962
5	VH_N056H	598.7	1.83E+05	1.23E-04	6.74E-10	268	265.5	256.6	0.966
5	VH_N058A	594	1.67E+05	1.39E-04	2.03E-09	262.3	257.1	236.4	0.919
5	VH_N058L	581.7	1.52E+05	1.86E-04	1.23E-09	250.1	243.3	231.8	0.953
5	VH_N058D	528.4	1.49E+05	2.18E-04	1.46E-09	227.5	221.6	209.7	0.946
5	VH_N058Y	568.6	1.48E+05	7.03E-04	4.75E-09	242	233.3	197.5	0.847
5	VH_N058H	569.5	1.31E+05	1.20E-03	9.15E-09	233.9	219.6	166.1	0.756
5	VH_Y059A	192.3	1.88E+05	1.94E-04	1.03E-09	90	89.4	85	0.951
5	VH_Y059K	577.4	1.51E+05	2.14E-04	1.42E-09	247.6	241.2	228.5	0.947
5	VH_Y059Q	604.4	1.67E+05	2.01E-04	1.20E-09	268.4	263.5	250.2	0.950
5	VH_Y059W	587.3	1.61E+05	2.05E-04	1.27E-09	257.8	252.4	239.6	0.949
5	VH_Y059S	596.1	1.72E+05	1.87E-04	1.09E-09	267.1	263.3	250.8	0.953
5	VH_Y059L	598.9	1.67E+05	1.98E-04	1.18E-09	267	262.7	249.7	0.951
5	VH_Y059D	600.1	1.79E+05	1.71E-04	9.57E-10	275.3	272.3	260.5	0.957
5	VH_Y059H	609.9	1.67E+05	1.76E-04	1.05E-09	272	267.3	255.2	0.955
5	VH_N060A	618.5	1.76E+05	1.63E-04	9.24E-10	278.1	274.7	263.1	0.958

Figura 29

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	k_a (1/Ats)	k_d (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
5	VH_N060K	613.1	1.67E+05	1.78E-04	1.06E-09	273.2	269	256.9	0.955
5	VH_N060Q	623.1	1.77E+05	1.53E-04	8.66E-10	281.5	278.2	267.1	0.960
5	VH_N060W	605.3	1.77E+05	1.53E-04	8.62E-10	273.6	270.6	259.9	0.960
5	VH_N060L	620.4	1.82E+05	1.38E-04	7.58E-10	272.5	270.1	260.2	0.963
5	VH_N060D	623.6	1.87E+05	1.62E-04	8.66E-10	287.8	285.5	273.5	0.958
5	VH_N060Y	622.3	1.81E+05	1.33E-04	7.33E-10	282.8	280.3	270.2	0.964
5	Parent clone	623.1	1.70E+05	1.66E-04	9.79E-10	278.3	274.1	262.4	0.957
6	VL_S034K	399.8	2.40E+04	3.73E-07	1.55E-11	5	0.9	3.3	3.667
6	VL_G050A	407.9	1.45E+05	1.86E-04	1.28E-09	172.8	167.2	159.4	0.953
6	VL_G050K	392.1	7.58E+04	6.76E-04	8.92E-09	121	99.4	84.9	0.894
6	VL_G050Q	403.2	9.54E+04	2.72E-04	2.85E-09	141.9	126.2	118.1	0.936
6	VL_G050W	393.6	7.54E+04	1.79E-04	2.38E-09	138.1	114.9	110	0.957
6	VL_G050S	401.2	1.35E+05	2.13E-04	1.38E-09	163.5	156.9	148.6	0.967
6	VL_Q024D	419	1.51E+05	1.46E-04	9.66E-10	181.1	176.8	170	0.962
6	VL_Q024S	380.5	1.46E+05	1.39E-04	9.52E-10	166.6	162.3	156.4	0.964
6	VL_Q024H	392.2	1.44E+05	1.44E-04	9.97E-10	166.3	161.5	155.5	0.963

Figura 30

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/MS)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tard/ unión temp
6	VL_G025A	383.7	1.17E+05	1.64E-04	1.40E-09	154.6	145.5	139.7	0.960
6	VL_N030A	402.5	1.74E+05	2.95E-04	1.70E-09	177.4	175	162.5	0.929
6	VL_G050H	385.3	9.19E+04	2.67E-04	2.90E-09	140.6	126	118	0.937
6	VL_K051D	400.9	6.14E+04	5.79E-04	9.42E-09	151.1	114.4	100.2	0.876
6	VL_K051H	394.9	1.34E+05	9.78E-05	7.30E-10	171.4	165.4	161.1	0.974
6	VL_N052K	407.2	1.01E+05	1.92E-04	1.90E-09	156.9	142.2	135.7	0.954
6	VL_N052W	403	1.21E+05	2.75E-04	2.27E-09	162.7	153.2	143.2	0.935
6	VL_N052S	382.7	1.42E+05	1.81E-04	1.27E-09	163.3	158.5	151.3	0.955
6	VL_N052L	398	1.06E+05	1.75E-04	1.65E-09	161.9	148.3	142	0.958
6	VL_N052D	398.7	1.50E+05	1.43E-04	9.50E-10	176	172.1	165.7	0.963
6	VL_N052Y	410.3	1.30E+05	2.01E-04	1.55E-09	168.2	160.7	152.7	0.950
6	VL_N052H	413.5	1.27E+05	1.90E-04	1.49E-09	169.3	160.9	153.4	0.953
6	VL_N053A	411.7	1.36E+05	2.23E-04	1.64E-09	172.2	165.6	156.6	0.946
6	VL_N053K	398.1	1.14E+05	2.13E-04	1.88E-09	152.2	142.3	135	0.949
6	VL_N053Q	375.2	1.41E+05	1.93E-04	1.37E-09	159.3	154.6	147.1	0.951
6	VL_N053W	399.4	1.01E+05	3.18E-04	3.14E-09	148.4	134.9	125	0.927
6	VL_N053S	390.8	1.51E+05	1.71E-04	1.14E-09	167.7	164.3	157	0.956

Figura 31

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temperana	unión tardía	unión tar/ unión temp
6	VL_R053L	411.2	1.32E+05	2.32E-04	1.76E-09	171.9	164.4	155.1	0.943
6	VL_R053D	418.1	1.64E+05	1.59E-04	9.69E-10	188.6	185.6	178.1	0.960
6	VL_R053H	391.1	1.26E+05	2.07E-04	1.65E-09	158.4	151.1	143.5	0.950
6	VL_R054A	401.5	1.45E+05	1.39E-04	9.54E-10	174	169.2	163	0.963
6	VL_R054K	428.1	1.46E+05	1.46E-04	9.99E-10	183.4	178	171.2	0.962
6	VL_R054Q	421.5	1.49E+05	1.33E-04	8.92E-10	182.9	178.2	172	0.965
6	VL_R054W	405.7	1.24E+05	1.18E-04	9.49E-10	165.7	157.6	152.6	0.968
6	VL_R054L	422.4	1.49E+05	1.26E-04	8.45E-10	184.6	179.6	173.6	0.967
6	VL_R054Y	405.2	1.42E+05	1.11E-04	7.84E-10	174.1	169.2	164.2	0.970
6	VL_R054H	413.7	1.45E+05	1.58E-04	1.09E-09	177	171.7	164.7	0.959
6	VL_P055A	395.2	1.37E+05	1.41E-04	1.03E-09	168.6	163.2	157.2	0.963
6	VL_P055K	418.4	1.22E+05	1.55E-04	1.27E-09	169.2	159.8	153.5	0.961
6	VL_P055L	392.7	1.40E+05	1.44E-04	1.03E-09	166.5	161.5	155.5	0.963
6	VL_P055D	412.4	1.41E+05	1.54E-04	1.09E-09	178	172.2	165.5	0.961
6	VL_P055Y	423.8	1.31E+05	1.59E-04	1.22E-09	175.1	167.1	160.3	0.959
6	VL_S056L	395.4	1.48E+05	1.38E-04	9.36E-10	169.6	165.6	159.6	0.964
6	VL_S056D	382.4	1.56E+05	1.40E-04	9.00E-10	168.5	165.5	159.4	0.963

Figura 32

comida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (1/Min)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
6	VL_S056Y	417.4	1.41E+05	1.38E-04	9.79E-10	174.7	169.2	163	0.963
6	VL_S056W	372.2	1.36E+05	1.38E-04	1.02E-09	154.2	149.2	143.8	0.964
6	VL_S056H	428.9	1.45E+05	1.35E-04	9.39E-10	181.9	176.8	170.3	0.963
6	VL_S056K	413.5	1.38E+05	1.40E-04	1.02E-09	171.5	165.9	159.8	0.963
6	VL_Y031L	400.6	1.21E+05	2.56E-02	2.11E-07	106.1	63.5	6.4	0.101
6	VH_W035L	430.2	1.17E+05	1.15E-04	9.87E-10	151.6	142.6	138.1	0.968
6	VH_W035D	84.2	8.74E+04	5.11E-04	5.85E-09	27.7	24.3	21.6	0.889
6	VH_W035H	415.3	1.18E+05	1.93E-04	1.63E-09	162.4	153.1	145.7	0.952
6	VH_S035aA	427.8	1.48E+05	1.25E-04	8.48E-10	180.4	175.8	169.8	0.966
6	VH_S035aD	432.7	1.07E+05	9.84E-04	9.23E-09	167.4	151.1	120.2	0.795
6	VH_S035aY	405.1	4.28E+04	6.71E-07	1.57E-11	5.9	3.7	6.2	1.676
6	VH_S035aQ	393.7	1.58E+05	2.15E-02	1.36E-07	132	90.4	7	0.077
6	VH_S035aW	415.5	5.61E+04	2.71E-06	4.83E-11	4.7	3.5	5.7	1.629
6	VH_S035aH	415.5	9.64E+04	3.19E-02	3.31E-07	86.2	42	6.4	0.152
6	VH_S035aK	419.7	7.61E+04	7.25E-08	9.53E-13	7.3	7.4	7.5	1.014
6	VH_E050A	428.8	1.51E+05	3.53E-03	2.33E-08	177.7	165.1	74.2	0.449
6	VH_E050K	391.5	2.15E+05	2.74E-07	1.27E-12	3.7	3.8	5.8	1.526

Figura 33

corrida #	sustitución aminoácido	nivel captura	ka (J/MS)	kd (J/s)	KD (M)	Rmax (RU)	unión temprana	unión tardía	unión tar/ unión temp
6	VH_E050Q	440.4	1.56E+05	5.21E-03	3.33E-08	181.1	163.4	51.7	0.316
6	VH_E050W	434.5	1.59E+05	1.83E-03	1.15E-08	6.1	12.8	5.9	0.461
6	VH_T057A	424.4	1.50E+05	1.94E-04	1.29E-09	181.6	177.1	168.5	0.951
6	VH_T057K	418.5	1.31E+05	1.91E-04	1.46E-09	169.2	161.8	154.1	0.952
6	VH_T057Q	418.3	1.53E+05	1.30E-04	8.52E-10	180.9	177.3	171.1	0.965
6	VH_T057W	406.2	1.52E+05	1.33E-04	8.73E-10	175.6	172.2	166.1	0.965
6	VH_T057S	441.8	1.53E+05	1.53E-04	1.01E-09	190.6	186.3	178.7	0.959
6	VH_T057L	420.7	1.52E+05	1.64E-04	1.08E-09	181.9	177.9	170.2	0.957
6	VH_T057D	431.8	1.65E+05	1.06E-04	6.40E-10	195.2	192.5	187	0.971
6	VH_T057V	423	1.51E+05	1.50E-04	9.96E-10	182	178.1	171.2	0.961
6	VH_T057H	417.9	1.45E+05	2.02E-04	1.39E-09	177.2	172.5	163.8	0.950
6	VH_N058K	408.4	1.24E+05	7.45E-04	6.01E-09	161.5	151.7	127.3	0.839
6	VH_N058Q	423	1.45E+05	1.11E-04	7.65E-10	180.7	176.1	170.7	0.969
6	VH_N058W	412.4	1.34E+05	4.73E-04	3.52E-09	171.3	164.4	146.8	0.893
6	VH_G098L	408.7	4.32E+04	5.30E-07	1.23E-11	6.1	3.8	6.6	1.737
6	Clon original	434.6	1.50E+05	1.60E-04	1.07E-09	186.1	181.8	174.3	0.959

Figura 34A

ANTICUERPO	Cadena pesada	Cadena ligera
ANTICUERPO 4	Tipo salvaje (WT)	Tipo salvaje (WT)
ANTICUERPO 1	S54F	WT
ANTICUERPO 2	S54Y	WT
ANTICUERPO 3	S54W	WT
ANTICUERPO 6	N56W	WT
ANTICUERPO 7	S54F + N56F	WT
ANTICUERPO 8	S54Y + N56F	WT
ANTICUERPO 9	S54W + N56F	WT
ANTICUERPO 10	S54F + N56Y	WT
ANTICUERPO 11	S54Y + N56Y	WT
ANTICUERPO 12	S54W + N56Y	WT
ANTICUERPO 13	S54F + N56W	WT
ANTICUERPO 14	S54Y + N56W	WT
ANTICUERPO 15	S54W + N56W	WT
ANTICUERPO 16	WT	D92S
ANTICUERPO 20	S35aA	WT
ANTICUERPO 21	W35L	WT
ANTICUERPO 22	Y52W	WT
ANTICUERPO 23	N56H	WT
ANTICUERPO 24	N56L	WT
ANTICUERPO 25	T57D	WT
ANTICUERPO 26	N58Q	WT
ANTICUERPO 27	N60Y	WT
ANTICUERPO 29	WT	G50S
ANTICUERPO 30	WT	K51A
ANTICUERPO 31	WT	K51H

Figura 34b

ANTICUERPO	Cadena pesada	Cadena ligera
ANTICUERPO32	WT	K51L
ANTICUERPO33	WT	R54L
ANTICUERPO34	WT	R54Q
ANTICUERPO35	WT	R54Y
ANTICUERPO36	Y102S	WT
ANTICUERPO37	Y102L	WT
ANTICUERPO38	Y102A	WT
ANTICUERPO39	Y102H	WT
ANTICUERPO40	S54F + N56W	K51H
ANTICUERPO 41	S54Y + N56W	K51H
ANTICUERPO 42	S54W + N56W	K51H
ANTICUERPO43	S54F + N56W	R54Y
ANTICUERPO44	S54Y + N56W	R54Y
ANTICUERPO45	S54W + N56W	R54Y
ANTICUERPO46	S54W+N60Y	WT
ANTICUERPO47	N56W+N60Y	WT
ANTICUERPO48	S54W+N56W+N60Y	WT
ANTICUERPO49	WT	K51H + R54L
ANTICUERPO50	WT	K51H + R54Y
ANTICUERPO 51	WT	N30S
ANTICUERPO52	S54Y + N56W	N30S
ANTICUERPO53	S54Y + N56Y	N30S
ANTICUERPO54	WT	D92E
ANTICUERPO55	S54Y + N56W	D92E
ANTICUERPO56	S54Y + N56Y	D92E
ANTICUERPO57	I82aS	WT
ANTICUERPO58	S54Y + N56W + I82aS	WT
ANTICUERPO 59	I82aS	N30S
ANTICUERPO 60	S54Y + N56W + I82aS	N30S

Figura 34C

ANTICUERPO	Cadena pesada	Cadena ligera
ANTICUERPO61	I82aS	D92E
ANTICUERPO62	S54Y + N56W + I82aS	D92E
ANTICUERPO63	S54Y + N56Y + I82aS	WT
ANTICUERPO64	S54Y + N56Y + I82aS	N30S
ANTICUERPO65	S54Y + N56Y + I82aS	D92E
ANTICUERPO66	S54Y + N56Y + I82aS	S93L
ANTICUERPO67	S54Y + N56Y + I82aS	S93E
ANTICUERPO68	S54Y + N56Y + I82aS	S93F
ANTICUERPO69	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+D92E
ANTICUERPO70	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93L
ANTICUERPO71	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93E
ANTICUERPO72	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93F
ANTICUERPO73	S54Y + N56Y	N30S
ANTICUERPO74	S54Y + N56Y	D92E
ANTICUERPO75	S54Y + N56Y	S93L
ANTICUERPO76	S54Y + N56Y	S93E
ANTICUERPO77	S54Y + N56Y	S93F
ANTICUERPO78	S54Y + N56Y	N30S+D92E
ANTICUERPO79	S54Y + N56Y	N30S+S93L
ANTICUERPO80	S54Y + N56Y	N30S+S93E
ANTICUERPO81	S54Y + N56Y	N30S+S93F

Figura 35

Ensayo de proliferación de NK-92

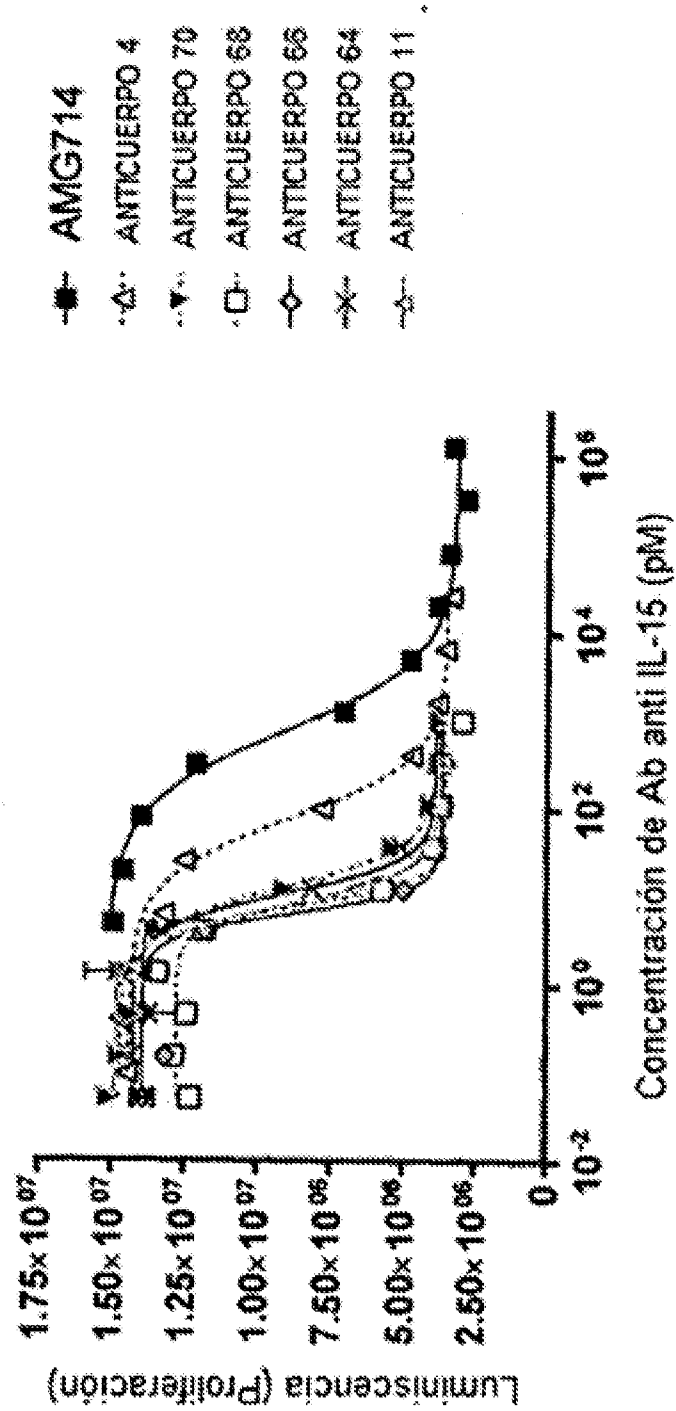


Figura 36

Muestra	Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)
Complejo de IL-15 humana	ANTICUERPO 70a	2.52e+05	3.47e-05	0.133
	ANTICUERPO 70b	2.49e+05	3.92e-05	0.154
	ANTICUERPO 70c	2.37e+05	4.31e-05	0.174
	ANTICUERPO 70f	2.49e+05	4.44e-05	0.171
	ANTICUERPO 4	1.48e+05	9.43e-05	0.630
	AMG714	2.09e+05	3.98e-04	1.86

Figura 37

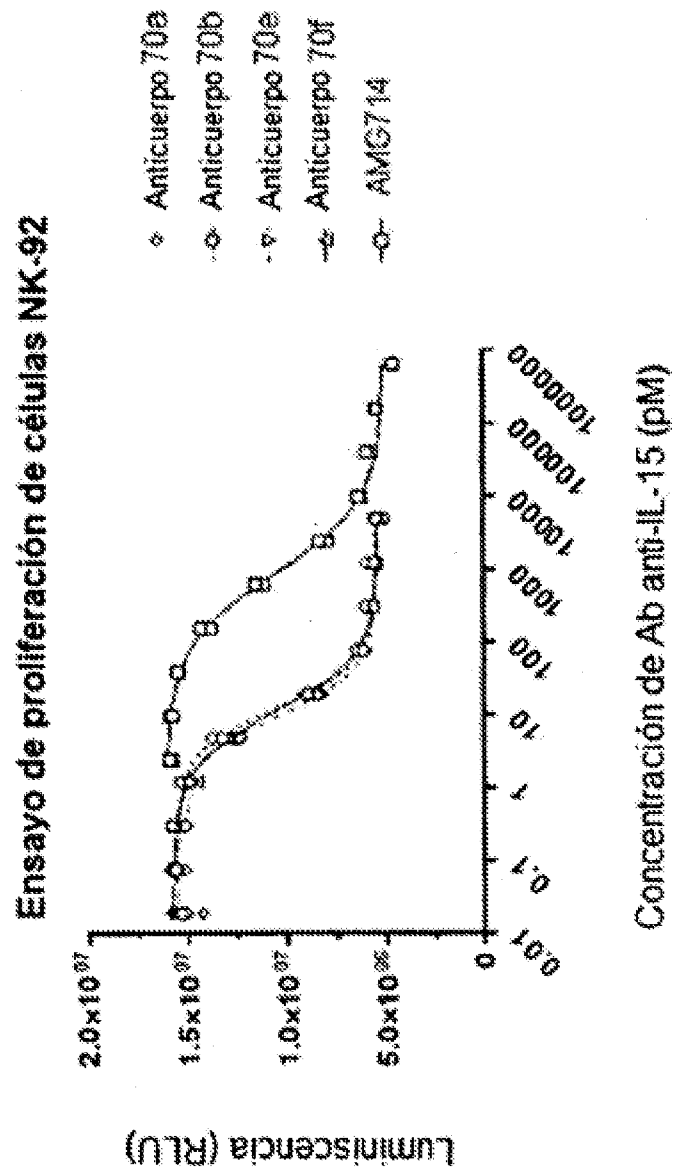


Figura 38

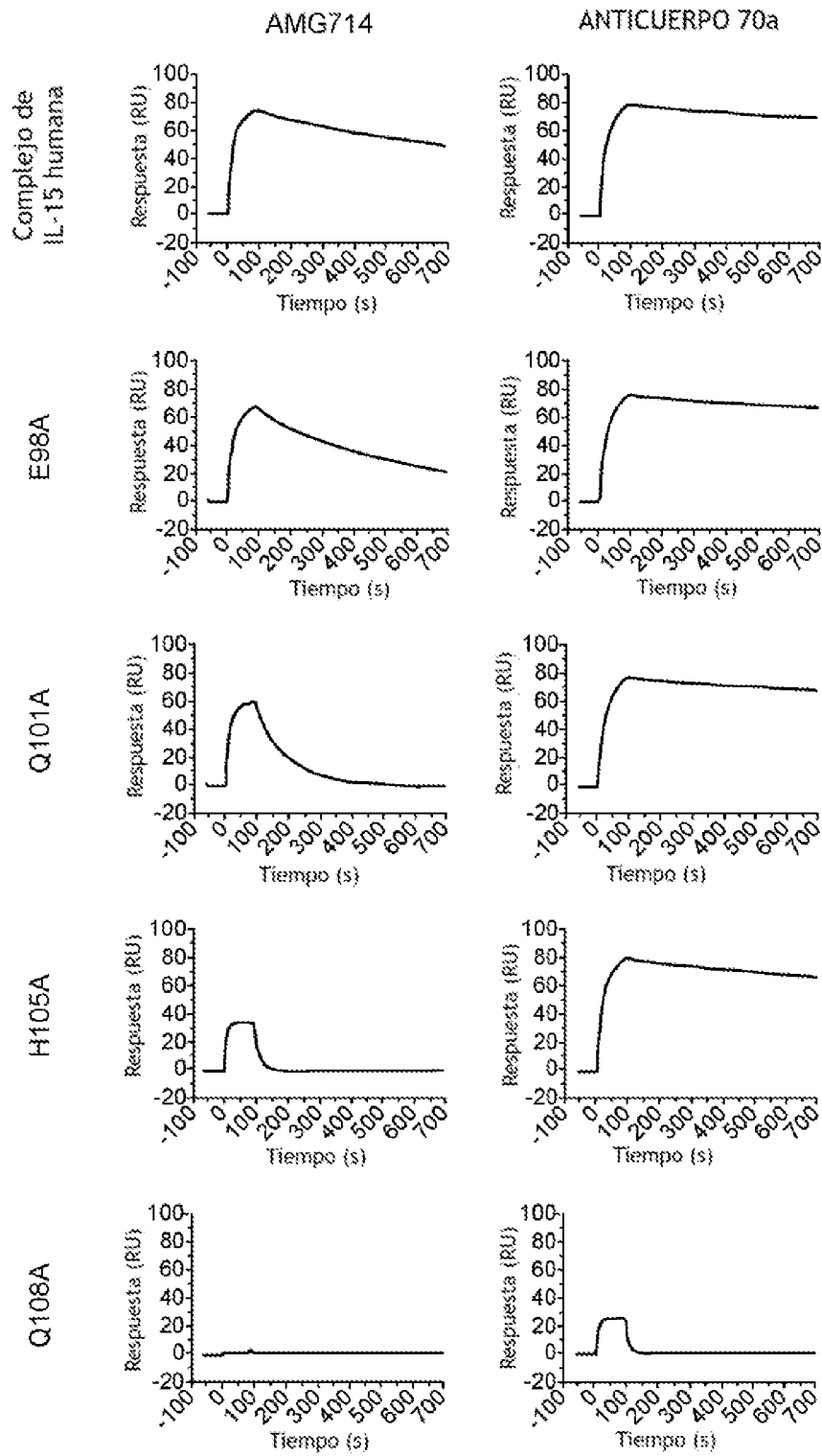


Figura 39A

A ANTICUERPO 70a

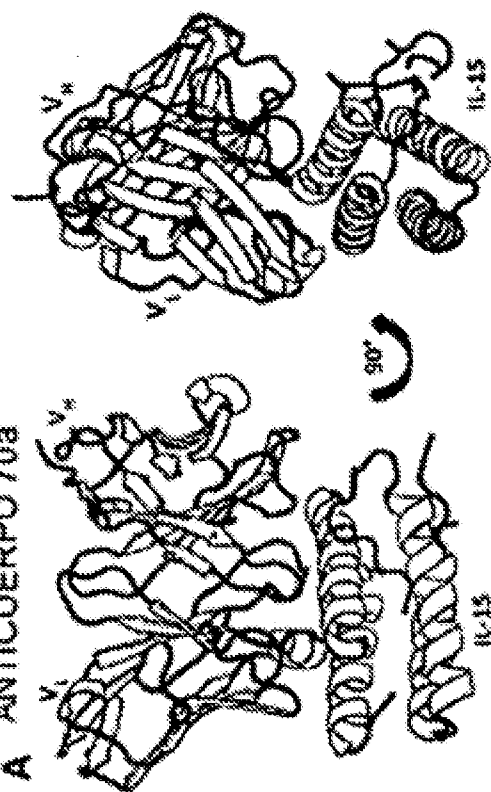


Figura 39B

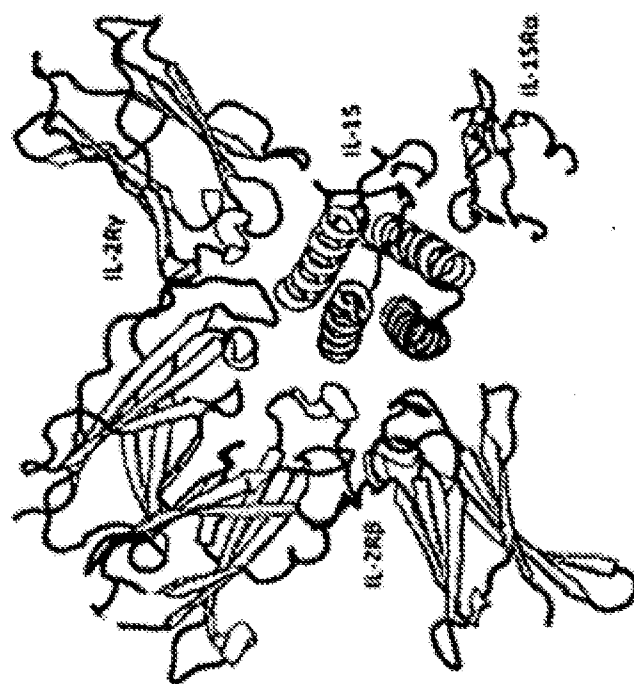


Figura 39E

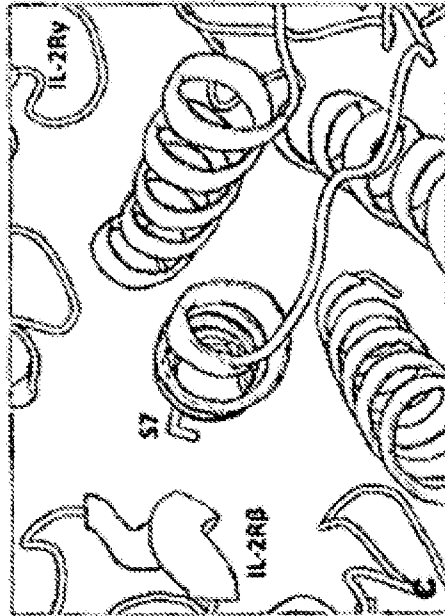


Figura 39C

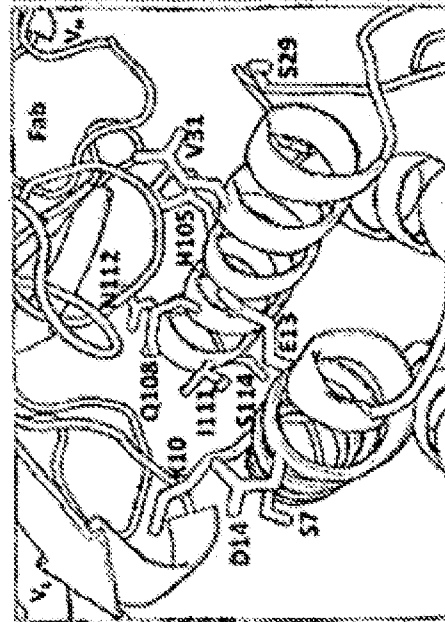
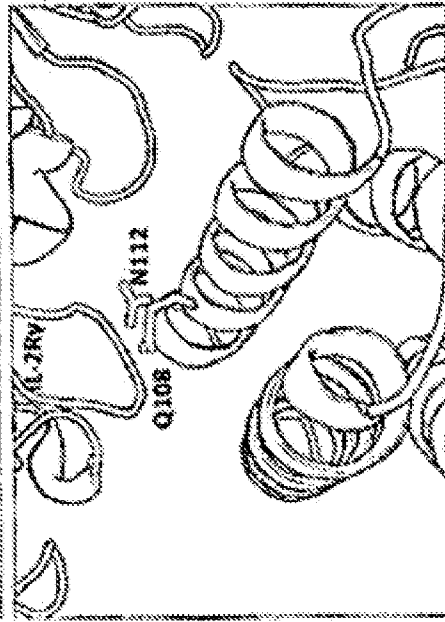


Figura 39D



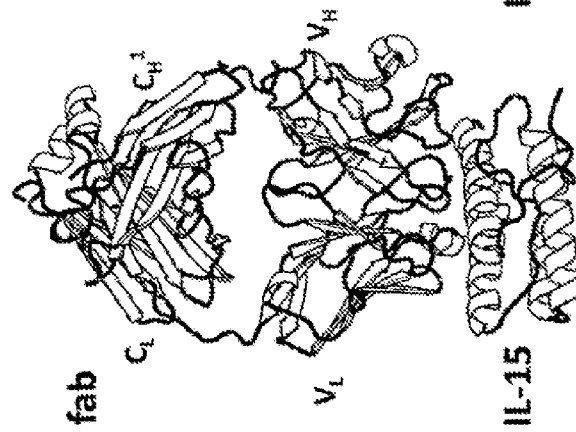


Figura 39F

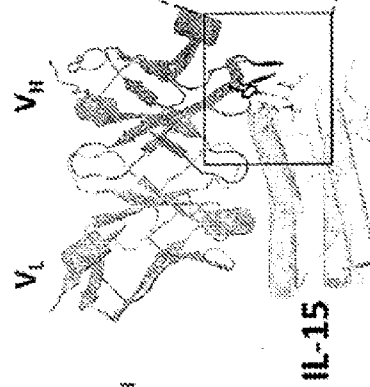


Figura 39G

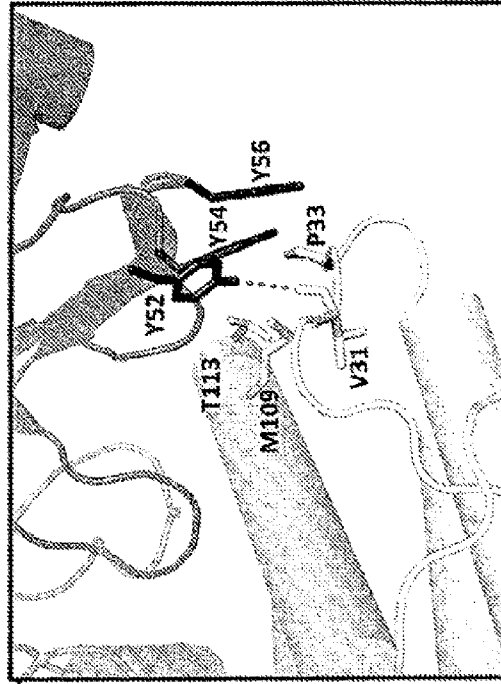


Figura 39H

Figura 40

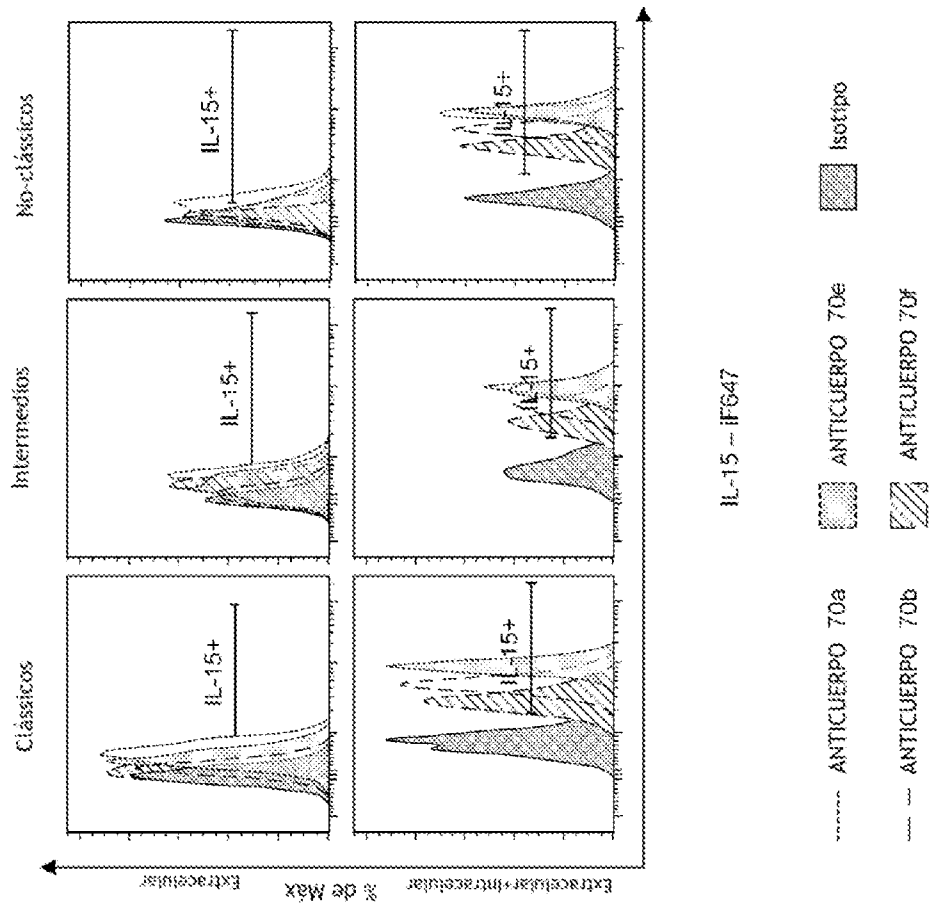


Figura 41

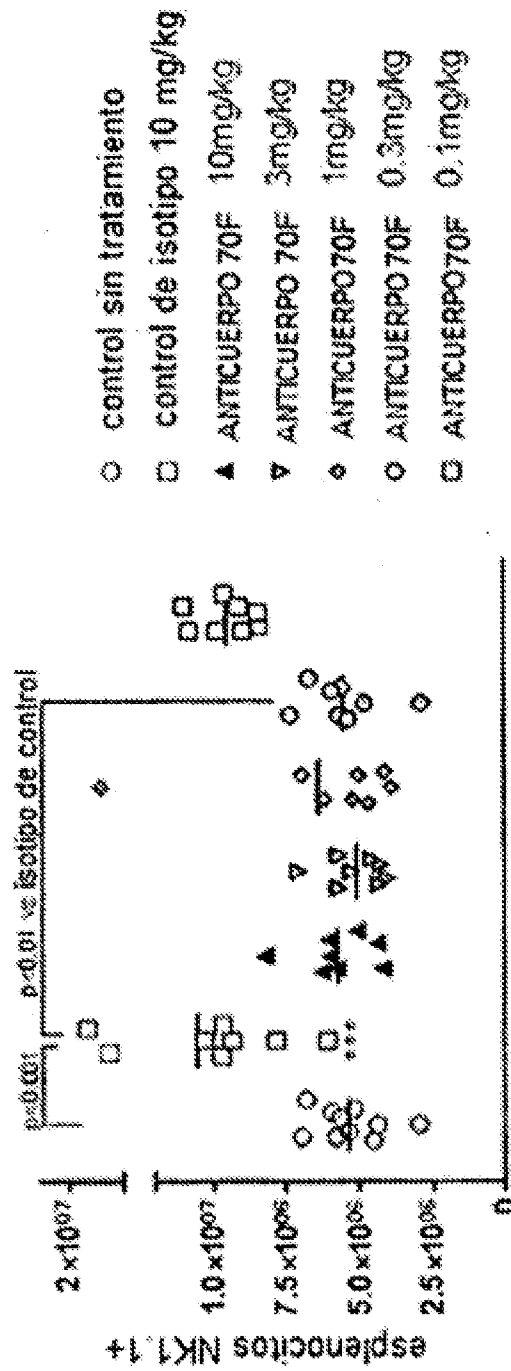
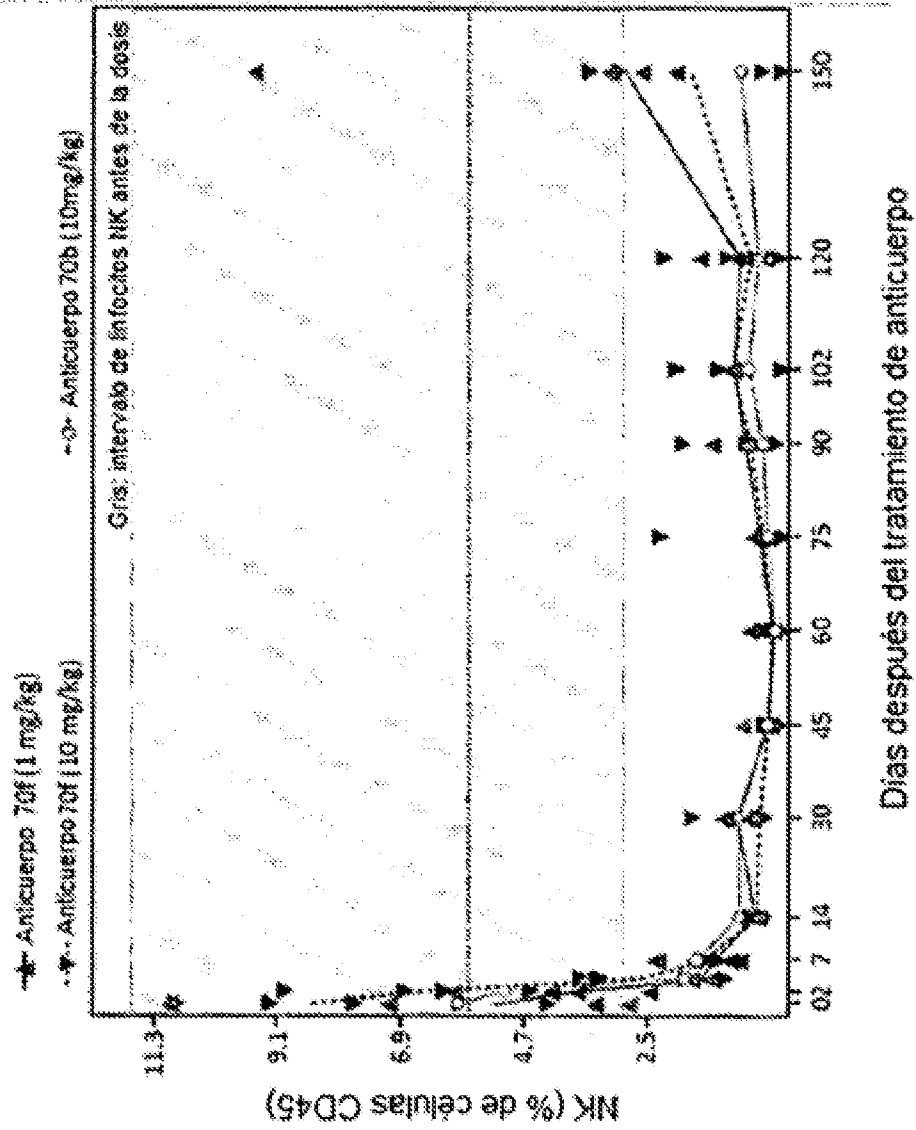


Figura 42



H1	H2	H3
58	18 o 19	20
59	18 o 19	20
60	18 o 19	20
61	18 o 19	20
62	18 o 19	20
63	18 o 19	20
64	18 o 19	20
65	18 o 19	20
66	18 o 19	20
67	18 o 19	20
68	18 o 19	20
69	18 o 19	20
70	18 o 19	20
71	18 o 19	20
72	18 o 19	20
73	18 o 19	20
74	18 o 19	20
75	18 o 19	20
76	18 o 19	20
77	18 o 19	20
78	18 o 19	20
79	18 o 19	20
80	18 o 19	20
81	18 o 19	20
82	18 o 19	20
83	18 o 19	20
84	18 o 19	20
85	18 o 19	20
86	18 o 19	20
87	18 o 19	20
88	18 o 19	20
89	18 o 19	20
90	18 o 19	20
91	18 o 19	20
92	18 o 19	20
93	18 o 19	20
94	18 o 19	20
95	18 o 19	20
96	18 o 19	20
97	18 o 19	20
98	18 o 19	20

H1	H2	H3
99	18 o 19	20
100	18 o 19	20
101	18 o 19	20
102	18 o 19	20
103	18 o 19	20
104	18 o 19	20
105	18 o 19	20
106	18 o 19	20
107	18 o 19	20
108	18 o 19	20
109	18 o 19	20
110	18 o 19	20
111	18 o 19	20
112	18 o 19	20
113	18 o 19	20
114	18 o 19	20
115	18 o 19	20
116	18 o 19	20
117	18 o 19	20
118	18 o 19	20
119	18 o 19	20
120	18 o 19	20
121	18 o 19	20
122	18 o 19	20
123	18 o 19	20
124	18 o 19	20
125	18 o 19	20
126	18 o 19	20
127	18 o 19	20
128	18 o 19	20
129	18 o 19	20
130	18 o 19	20
131	18 o 19	20
132	18 o 19	20
133	18 o 19	20
134	18 o 19	20
135	18 o 19	20

Figura 43A

H1	H2	H3
453	136	20
453	137	20
453	138	20
453	139	20
453	140	20
453	141	20
453	142	20
453	143	20
453	144	20
453	145	20
453	146	20
453	147	20
453	148	20
453	149	20
453	150	20
453	151	20
453	152	20
453	153	20
453	154	20
453	155	20
453	156	20
453	157	20
453	158	20
453	159	20
453	160	20
453	161	20
453	162	20
453	163	20
453	164	20
453	165	20
453	166	20

H1	H2	H3
453	167	20
453	168	20
453	169	20
453	170	20
453	171	20
453	172	20
453	173	20
453	174	20
453	175	20
453	176	20
453	177	20
453	178	20
453	179	20
453	180	20
453	181	20
453	182	20
453	183	20
453	184	20
453	185	20
453	186	20
453	187	20
453	188	20
453	189	20
453	190	20
453	191	20
453	192	20
453	193	20
453	194	20
453	195	20
453	196	20
453	197	20

H1	H2	H3
453	198	20
453	199	20
453	200	20
453	201	20
453	202	20
453	203	20
453	204	20
453	205	20
453	206	20
453	207	20
453	208	20
453	209	20
453	210	20
453	211	20
453	212	20
453	213	20
453	214	20
453	215	20
453	216	20
453	217	20
453	218	20
453	219	20
453	220	20
453	221	20
453	222	20
453	223	20
453	224	20
453	225	20
453	226	20

Figura 43B

H1	H2	H3
453	18 o 19	227
453	18 o 19	228
453	18 o 19	229
453	18 o 19	230
453	18 o 19	231
453	18 o 19	232
453	18 o 19	233
453	18 o 19	234
453	18 o 19	235
453	18 o 19	236
453	18 o 19	237
453	18 o 19	238
453	18 o 19	239
453	18 o 19	240
453	18 o 19	241
453	18 o 19	242
453	18 o 19	243
453	18 o 19	244
453	18 o 19	245
453	18 o 19	246
453	18 o 19	247
453	18 o 19	248
453	18 o 19	249
453	18 o 19	250
453	18 o 19	251
453	18 o 19	252
453	18 o 19	253
453	18 o 19	254
453	18 o 19	255
453	18 o 19	256
453	18 o 19	257
453	18 o 19	258
453	18 o 19	259
453	18 o 19	260
453	18 o 19	261
453	18 o 19	262
453	18 o 19	263
453	18 o 19	264
453	18 o 19	265
453	18 o 19	266
453	18 o 19	267
453	18 o 19	268

H1	H2	H3
453	18 o 19	269
453	18 o 19	270
453	18 o 19	271
453	18 o 19	272

Figura 43C

L1	L2	L3
273	28	30, 31, e 519
274	28	30, 31, o 519
275	28	30, 31, o 519
276	28	30, 31, o 519
277	28	30, 31, o 519
278	28	30, 31, o 519
279	28	30, 31, o 519
280	28	30, 31, o 519
281	28	30, 31, o 519
282	28	30, 31, o 519
283	28	30, 31, o 519
284	28	30, 31, o 519
285	28	30, 31, o 519
286	28	30, 31, o 519
287	28	30, 31, e 519
288	28	30, 31, o 519
289	28	30, 31, o 519
290	28	30, 31, o 519
291	28	30, 31, o 519
292	28	30, 31, o 519
293	28	30, 31, o 519
294	28	30, 31, o 519
295	28	30, 31, o 519
296	28	30, 31, o 519
297	28	30, 31, o 519
298	28	30, 31, o 519
299	28	30, 31, o 519
300	28	30, 31, o 519
301	28	30, 31, o 519
302	28	30, 31, o 519
303	28	30, 31, o 519
304	28	30, 31, o 519
305	28	30, 31, o 519
306	28	30, 31, o 519
307	28	30, 31, o 519
308	28	30, 31, o 519
309	28	30, 31, o 519
310	28	30, 31, o 519
311	28	30, 31, o 519
312	28	30, 31, o 519

L1	L2	L3
313	28	30, 31, o 519
314	28	30, 31, o 519
315	28	30, 31, o 519
316	28	30, 31, o 519
317	28	30, 31, o 519
318	28	30, 31, o 519
319	28	30, 31, o 519
320	28	30, 31, o 519
321	28	30, 31, o 519
322	28	30, 31, o 519
323	28	30, 31, e 519
324	28	30, 31, o 519
325	28	30, 31, o 519
326	28	30, 31, o 519
327	28	30, 31, o 519
328	28	30, 31, o 519
329	28	30, 31, o 519

Figura 44A

L1	L2	L3
26 o 27	330	30, 31, o 519
26 o 27	331	30, 31, o 519
26 o 27	332	30, 31, o 519
26 o 27	333	30, 31, o 519
26 o 27	334	30, 31, o 519
26 o 27	335	30, 31, o 519
26 o 27	336	30, 31, o 519
26 o 27	337	30, 31, o 519
26 o 27	338	30, 31, o 519
26 o 27	339	30, 31, o 519
26 o 27	340	30, 31, o 519
26 o 27	341	30, 31, o 519
26 o 27	342	30, 31, o 519
26 o 27	343	30, 31, o 519
26 o 27	344	30, 31, o 519
26 o 27	345	30, 31, o 519
26 o 27	346	30, 31, o 519
26 o 27	347	30, 31, o 519
26 o 27	348	30, 31, o 519
26 o 27	349	30, 31, o 519
26 o 27	350	30, 31, o 519
26 o 27	351	30, 31, o 519
26 o 27	352	30, 31, o 519
26 o 27	353	30, 31, o 519
26 o 27	354	30, 31, o 519
26 o 27	355	30, 31, o 519
26 o 27	356	30, 31, o 519
26 o 27	357	30, 31, o 519
26 o 27	358	30, 31, o 519
26 o 27	359	30, 31, o 519
26 o 27	360	30, 31, o 519
26 o 27	361	30, 31, o 519
26 o 27	362	30, 31, o 519
26 o 27	363	30, 31, o 519
26 o 27	364	30, 31, o 519
26 o 27	365	30, 31, o 519
26 o 27	366	30, 31, o 519
26 o 27	367	30, 31, o 519
26 o 27	368	30, 31, o 519
26 o 27	369	30, 31, o 519

L1	L2	L3
26 o 27	370	30, 31, o 519
26 o 27	371	30, 31, o 519
26 o 27	372	30, 31, o 519
26 o 27	373	30, 31, o 519
26 o 27	374	30, 31, o 519
26 o 27	375	30, 31, o 519
26 o 27	376	30, 31, o 519
26 o 27	377	30, 31, o 519
26 o 27	378	30, 31, o 519
26 o 27	379	30, 31, o 519
26 o 27	380	30, 31, o 519
26 o 27	381	30, 31, o 519
26 o 27	382	30, 31, o 519
26 o 27	383	30, 31, o 519
26 o 27	384	30, 31, o 519
26 o 27	385	30, 31, o 519
26 o 27	386	30, 31, o 519
26 o 27	387	30, 31, o 519
26 o 27	388	30, 31, o 519
26 o 26	389	30, 31, o 519
26 o 26	390	30, 31, o 519

Figura 44B

I1	I2	I3
26 o 27	28	381
26 o 27	28	382
26 o 27	28	393
26 o 27	28	394
26 o 27	28	395
26 o 27	28	396
26 o 27	28	397
26 o 27	28	398
26 o 27	28	399
26 o 27	28	400
26 o 27	28	401
26 o 27	28	402
26 o 27	28	403
26 o 27	28	404
26 o 27	28	405
26 o 27	28	406
26 o 27	28	407
26 o 27	28	408
26 o 27	28	409
26 o 27	28	410
26 o 27	28	411
26 o 27	28	412
26 o 27	28	413
26 o 27	28	414
26 o 27	28	415
26 o 27	28	416
26 o 27	28	417
26 o 27	28	418
26 o 27	28	419
26 o 27	28	420
26 o 27	28	421
26 o 27	28	422
26 o 27	28	423
26 o 27	28	424
26 o 27	28	425
26 o 27	28	426
26 o 27	28	427
26 o 27	28	428
26 o 27	28	429
26 o 27	28	430

I1	I2	I3
26 o 27	28	431
26 o 27	28	432
26 o 27	28	433
26 o 27	28	434
26 o 27	28	435
26 o 27	28	436
26 o 27	28	437
26 o 27	28	438
26 o 27	28	439
26 o 27	28	440
26 o 27	28	441
26 o 27	28	442
26 o 27	28	443
26 o 27	28	444
26 o 27	28	445
26 o 27	28	446
26 o 27	28	447
26 o 27	28	448
26 o 27	28	449
26 o 27	28	450
26 o 27	28	451
26 o 27	28	452
26 o 27	28	453
26 o 27	28	454
26 o 27	28	455
26 o 27	28	456
26 o 27	28	457
26 o 27	28	458
26 o 27	28	459
26 o 27	28	460
26 o 27	28	461
26 o 27	28	462
26 o 27	28	463
26 o 27	28	464
26 o 27	28	465
26 o 27	28	466
26 o 27	28	467
26 o 27	28	468
26 o 27	28	469
26 o 27	28	470

I1	I2	I3
26 o 27	28	471
26 o 27	28	472
26 o 27	28	473
26 o 27	28	474

Figura 44C

Figura 45A

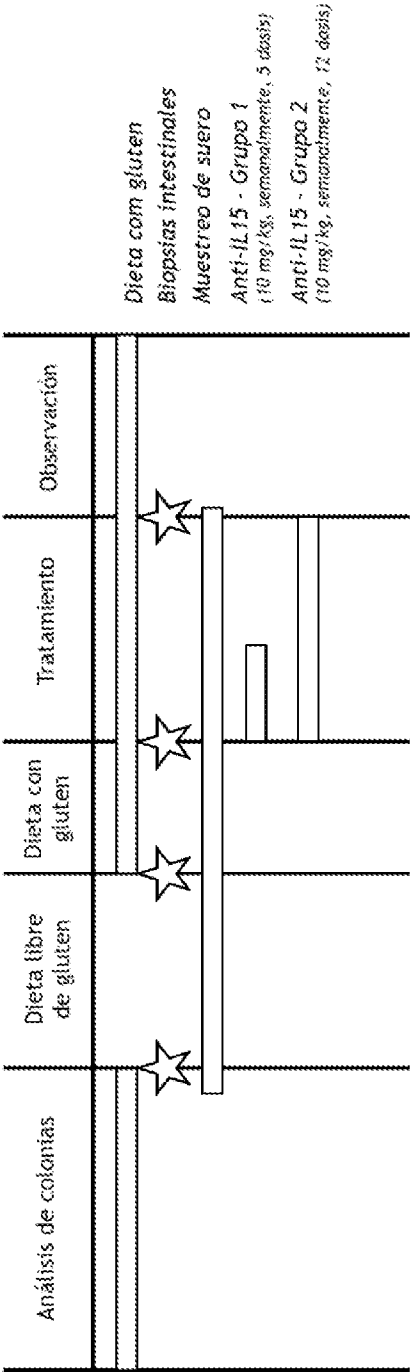


Figura 45B

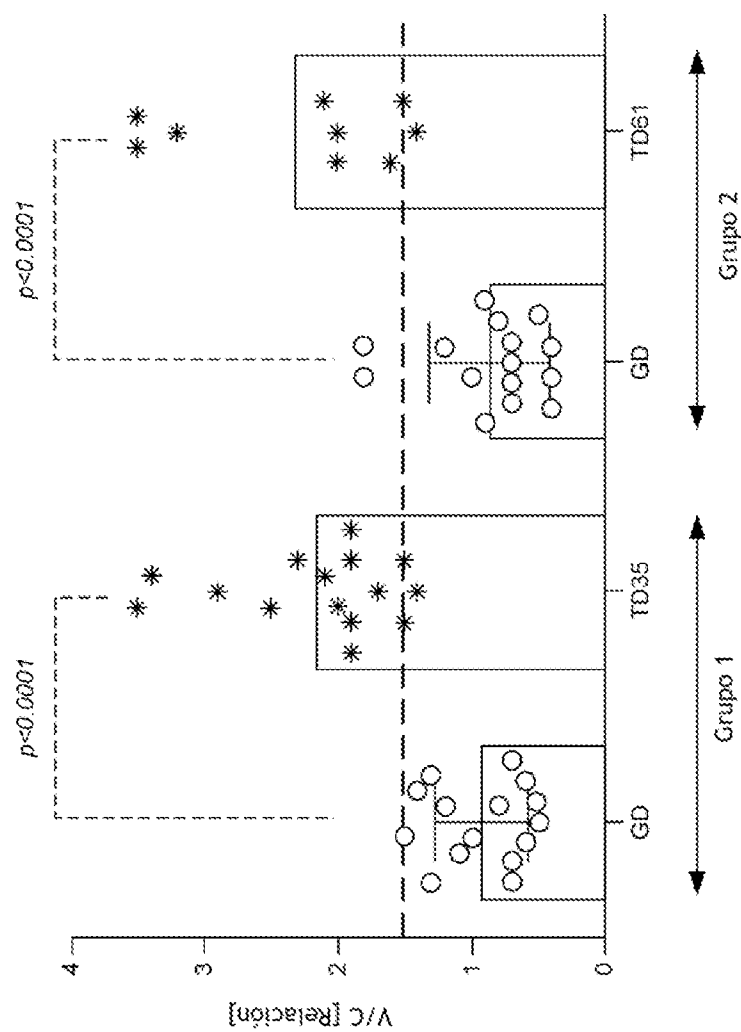


Figura 45C

Conteos IEL

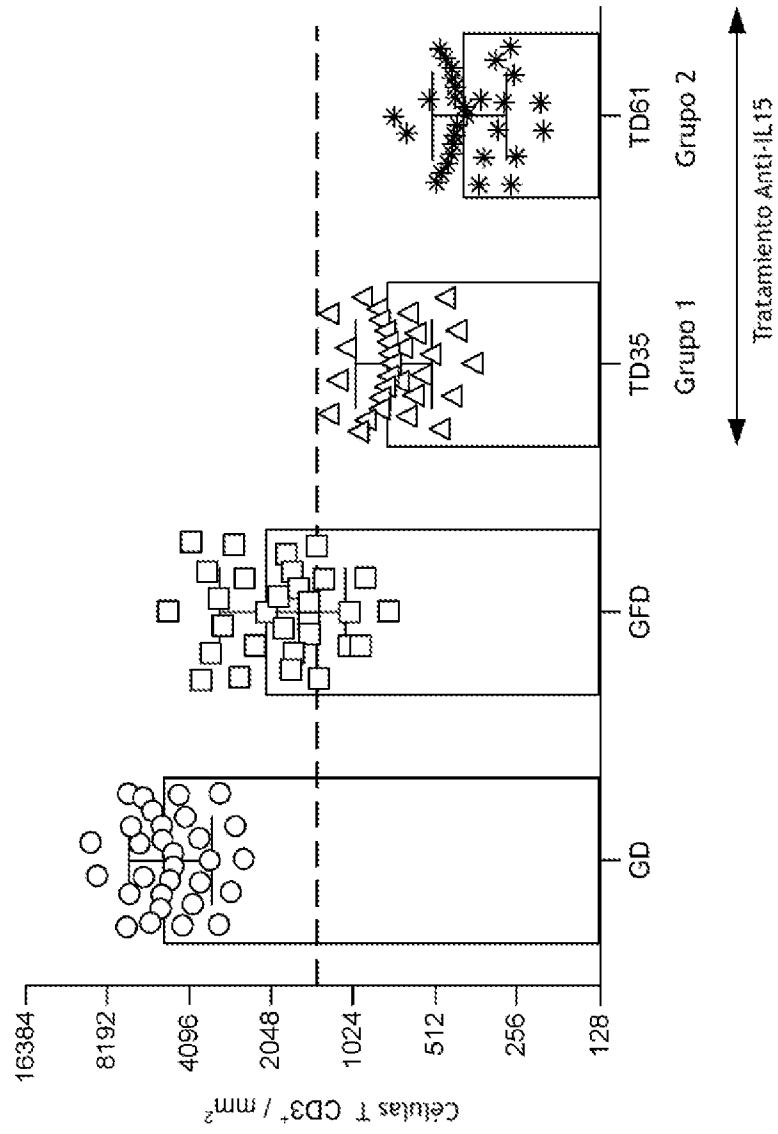


Figura 45D

