

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 062**

21 Número de solicitud: 200931158

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
28.06.2011

71 Solicitante/s: **RESEARCH CENTER BORSTEL
Parkallee 1-40
23845 Borstel, DE
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.**

72 Inventor/es: **Fioravanti, Jessica;
Ochoa Nieto, María del Carmen;
Palazón García, Francisco de Asís;
Berraondo López, Pedro;
Melero Bermejo, Ignacio Javier;
Bulfone-Paus, Silvia;
Medina Echeverz, José y
Duitman, Erwin**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Nuevos conjugados y composiciones para inmunoterapia y tratamiento anti-tumoral.**

57 Resumen:

Nuevos conjugados y composiciones para inmunoterapia y tratamiento anti-tumoral.

La presente invención se relaciona con composiciones que presentan capacidad de promover tanto la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adaptativa en un sujeto basadas en el uso conjunto de ApoA, interleuquina 15 y del dominio sushi de la cadena alfa del receptor de IL15, así como al uso de estas composiciones para estimular la respuesta inmune en un paciente y en métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y neoplásicas.

ES 2 362 062 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevos conjugados y composiciones para inmunoterapia y tratamiento anti-tumoral.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuentra dentro del ámbito de la inmunología y, más concretamente, en el campo de composiciones que presentan capacidad de promover tanto la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adaptativa en un sujeto. Estas composiciones son de utilidad para el tratamiento de todas aquellas enfermedades que requieran de una mayor actividad del sistema inmune como, por ejemplo, tumores y enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la invención

La interleuquina 15 (IL15 o IL15) es una citoquina imprescindible para la actividad de células NK, NKT y linfocitos T CD8 memoria. Ejerce su función por medio de un receptor que consta de 3 subunidades denominadas α , β y γ . Las subunidades β y γ son comunes al receptor de IL-2. La cadena α del receptor de IL15 es único para la IL15 y es necesario para la salida al medio extracelular de la citoquina [Duitman, E.H., *et al.*, Mol Cell Biol, 2008. 28:4851-61] y “presenta” la IL15 a las subunidades IL15R β y IL15R γ .

Debido a las propiedades estimulantes del sistema inmune, esta interleuquina tiene propiedades anti-tumorales dependientes de la presencia de células NK (Suzuki, 2001, J. Leukoc. Biol., 69:531-537) y de células T (Hazama, 1999, Br. J. Cancer., 80:1420-1426, Meazza, 2000, Int. J. Cancer, 87:574-581 y Klebanoff, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101:1969-1974). IL15 también está implicada en la protección frente a infecciones virales y en la expansión y mantenimiento de una respuesta basada en células T en la inmunización y desarrollo de células dendríticas.

Por tanto, IL15 puede ser un agente terapéutico útil en el tratamiento de enfermedades en las que se encuentra involucrado el sistema inmune. Sin embargo, los estudios *in vivo* para caracterizar la función de IL15 se han visto impedidos debido en parte a la falta de disponibilidad de IL15 recombinante y al bajo nivel de secreción observado cuando IL15 se expresa a partir del gen nativo. Adicionalmente, la mayor parte de las citoquinas tienen vidas medias en plasma muy reducidas dado que se producen *in vivo* de forma local y transitoria. Por tanto, el uso de IL15 *in vivo* requiere el uso de dosis relativamente altas y administraciones frecuentes, lo que resulta en distintos efectos secundarios que pueden resultar en que pacientes que sufren de cáncer no pueden tolerar el tratamiento.

Con el fin de evitar estas desventajas, IL15 ha sido utilizada en terapia antitumoral en combinación con otros tratamientos como anticuerpos anti-CD40, IL-7 o IL-6 [Chou, P.C., *et al.*, 2009, Vet Immunol Immunopathol, 130:25-34; Lin, C.Y., *et al.*, Cancer Lett, 2008. 272(2): p. 285-95; Zhang, M., *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106:7513-8 and Cha, E., *et al.*, Breast Cancer Res Treat, 2009]. Estas combinaciones muestran un efecto sinérgico lo que permite alcanzar efectos similares con menores dosis de IL15.

Otra posibilidad de aumentar la actividad de IL15 consiste en su co-administración con una proteína de fusión que comprende la región constante de una inmunoglobulina y la región soluble de la cadena α del receptor de IL15, lo que resulta en un aumento de 50 veces en la actividad de IL15 (Rubinstein M.P. *et al.*, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9166-71 y Stoklasek T.A. *et al.*, 2006, J. Immunol.; 177:6072-80).

Recientemente se ha demostrado que un polipéptido formado por los aminoácidos 1 al 77 del extremo amino terminal de la cadena α del receptor de IL15 (el llamado “dominio sushi”) es un agonista de la IL15 [Mortier, E., *et al.*, J Biol Chem, 2006. 281(3): p. 1612-9]. Así, la administración de una proteína de fusión que contiene dicho dominio e IL15 muestra un efecto antitumoral superior al de IL15 y que resulta en la disminución del 65% en el número de metástasis en pulmón del tumor B16F10 y en la disminución del número de metástasis de tumor HCT-116 humano implantado en el intestino ciego de ratones nude [Bessard, A., *et al.*, Mol Cancer Ther, 2009. 8(9): p. 2736-45].

Otra alternativa para conseguir mejorar el efecto de IL15 sin incurrir en efectos secundarios indeseados consiste en modificar la molécula con el fin de aumentar su vida media. Así, US2006257361 describe proteínas de fusión que comprenden la región constante de una inmunoglobulina e IL15 que presentan vidas medias en suero tras su administración superiores a IL15 no modificada.

No obstante, existe una necesidad en el estado de la técnica de formulaciones alternativas de IL15 en las que la proteína mantenga su actividad promotora de la respuesta inmune pero que permitan reducir al máximo los efectos secundarios asociados con IL15.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende, juntos o separados,

- (i) un primer componente seleccionado del grupo de
- (a) un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo y

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de

(a) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y

(b) un polinucleótido que codifica IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y

(iii) un tercer componente seleccionado del grupo de

(a) el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo y

(b) un polinucleótido que codifica el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende

(i) una región A formada por un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo,

(ii) una región B formada por IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y

(iii) una región C formada por el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En sucesivos aspectos, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de la invención, con un vector o una construcción génica que comprende un polinucleótido de la invención, con una célula huésped que comprende una proteína de fusión de la invención, con un polinucleótido de la invención, con un vector de la invención o una construcción génica de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, una célula huésped de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno que comprende poner en contacto una población de linfocitos previamente expuestos *in vivo* a dicho antígeno con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, una célula huésped de la invención.

Adicionalmente, la invención se relaciona con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, una célula huésped de la invención para su uso en medicina o para la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cinética de la expresión de hIL15 (ng/mL) en el tiempo t (h: horas). Grupos de Ratones C57B16 recibieron una inyección hidrodinámica con los plásmidos pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, phIL15, phIL15 + pSushi, pApo o solución salina (S). A las 8, 24, 96, 168 y 240 horas se extrajo sangre y se analizó mediante ELISA la concentración sérica de hIL15. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2-3 animales por grupo. Los resultados se compararon estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas, seguido de un test de Bonferroni. Se observan diferencias significativas entre los niveles de hIL15 a las 8 y 24 h del grupo tratados con pApo-hIL15 con respecto al resto de los grupos ($p < 0,001$).

Figura 2. Ensayo funcional de proliferación de pApo-hIL15 coadministrado con pSushi mediante inyección hidrodinámica. Se cultivaron células CTLL2 con diluciones seriadas de sueros obtenidos a las 24 h de tratar ratones con pApo-hIL15 y pApo-hIL15 + pSushi. A las 48 h se estudió la incorporación de timidina tritiada a células CTLL2 como índice de proliferación (c.p.m.) y se observó que los sueros de los ratones tratados simultáneamente con pApo-hIL15 y pSushi inducían una mayor proliferación que los sueros de ratones tratados únicamente con pApo-hIL15 ($p < 0,001$). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 4-5 animales por grupo. Los resultados se compararon estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas.

Figura 3. Aumento del número total y porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los esplenocitos totales en el tiempo (t (d), en días). Grupos de ratones C57B16 recibieron por inyección hidrodinámica las distintas construcciones plasmídicas y a los 3, 4, 5, 6 y 7 días se sacrificaron y se extirparon los bazo. Se analizó el número de células T CD8⁺ (A), el porcentaje de células T CD8⁺ respecto a esplenocitos totales (B), el número de células T

memoria CD8⁺CD44⁺ (C) y el porcentaje de células T memoria CD8⁺CD44⁺ respecto a esplenocitos totales (D). El grupo de ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi (■) presentan mayor número de células T CD8⁺ que el resto de los grupos: pApo-hIL15 (□), pHIL15 + pSushi (▲), pHIL15 (Δ), pApo (○) y vehículo salino (*). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pApo-hIL15 + pSushi y el grupo pHIL15 + pSushi * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001.

Figura 4. Aumento del porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los linfocitos totales del hígado en el tiempo (t (d), en días). Ratones C57B16 recibieron por vía hidrodinámica las distintas construcciones. A los 3, 4, 5, 6 y 7 días se sacrificaron y se aislaron los hígados. Se analizó el porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los linfocitos totales. El grupo de ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi (■) presentaron mayor porcentaje de células T CD8⁺ que el resto de los grupos: pApo-hIL15 (□), pHIL15 + pSushi (▲), pHIL15 (Δ), pApo (●) y vehículos salino (*). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pApo-hIL15 + pSushi y el grupo pHIL15 + pSushi * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001.

Figura 5. Aumento del número total y porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los linfocitos de sangre periférica. Ratones C57B16 recibieron por vía hidrodinámica las distintas construcciones con pHIL15. A los 3, 4, 5 y 6 días se obtuvo sangre y se estudió el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (A), el de células T memoria CD8⁺CD44⁺ (B), y los porcentajes de células memoria efectoras CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (C) y centrales CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (D). En todas las poblaciones estudiadas, el grupo de ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi (■) presentaron mayor porcentaje de células T CD8⁺ que el resto de los grupos: pApo-hIL15 (□), pHIL15 + pSushi (▲), pHIL15 (Δ), pApo (●), pSushi (∇) y vehículo salino (*). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 3 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pApo-hIL15 + Sushi y el grupo pHIL15 + pSushi * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001.

Figura 6. Efecto antitumoral en el tiempo (t (d), en días) de las construcciones en el modelo de tumor subcutáneo CT26. Ratones Balb/c recibieron por vía subcutánea 5x10⁵ células CT26 y a los 3 días fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, pHIL15, pHIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). Se midieron los tumores en mm² con un calibre digital cada 2 días (A), y se observó el tiempo de supervivencia (% SV) de los animales (B). Se vio que los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi presentaron un retraso en el crecimiento de los tumores y una mayor supervivencia que los ratones del resto de los grupos. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 8 animales por grupo.

Figura 7. Efecto antitumoral en el tiempo (t (d): en días) de los plásmidos en el modelo de tumor subcutáneo MC38. Ratones C57B16 recibieron por vía subcutánea 5x10⁵ células MC38 y a los 6 días fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, pHIL15, pHIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). Se midieron los tumores en mm² con un calibre digital cada 2 días (A), y se observó el tiempo de supervivencia (% SV) de los animales (B). Se vio que los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi presentaron un retraso en el crecimiento de los tumores. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo.

Figura 8. Efecto antimetastásico de los distintos plásmidos en el modelo de tumor intraesplénico MC38. Ratones C57B16 recibieron por vía intraesplénica 5x10⁵ células MC38 y al día siguiente fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, pHIL15, pHIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). A los 19 días se sacrificaron los ratones y se dividieron los ratones en 3 grupos: I, ratones fallecidos debido a las metástasis hepáticas o con metástasis generalizada; II, ratones que presentan metástasis en parte del tejido hepático; III, ratones libres de metástasis hepática. Se muestran datos de un experimento representativo.

Figura 9. Efecto de los distintos plásmidos en ratones "knock out" para el receptor α de IL15. Cuatro ratones carentes del receptor α de IL15 fueron tratados por hidrodinámica con los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi, pHIL15 y pSushi, pApo y pApo-hIL15. Se sacrificaron a los 5 días, se extrajo el bazo y se estudiaron las poblaciones esplénicas de células NK y linfocitos T CD8⁺ memoria mediante citometría de flujo usando el marcador CD3 para su diferenciación. En la figura se incluye además las poblaciones de NK y T CD8⁺ memoria de un ratón C57B16 no mutado. Se muestra el porcentaje de células NK (A) de los ratones estudiados, los linfocitos T CD8⁺ (B) y la subpoblación CD8⁺CD44⁺ (C). Se indican los porcentajes de células respecto a los esplenocitos totales.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la coadministración de una ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende IL15 fusionada a la proteína ApoA junto con el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15 (en adelante IL15 α R-sushi) resulta en una actividad de IL15 superior a la observada cuando se administran conjuntamente IL15 e IL15 α R-sushi. Dicha actividad superior es resultado no sólo de los mayores y más duraderos niveles circulantes de IL15 obtenidos tal y como se observa en el ejemplo 3 de la

presente invención, sino en la capacidad de inducir la proliferación de células CTLL2 (ejemplo 4 de la presente invención), la capacidad de promover la proliferación de linfocitos T CD8 y CD8 memoria intraesplénicos, de linfocitos T CD8 intrahepáticos y de linfocitos T CD8 en sangre (ejemplo 5 de la presente invención) y en un mayor efecto antitumoral en dos modelos experimentales de tumores (ejemplo 7 de la presente invención) y en un efecto anti-metastático (ejemplo 8 de la presente invención).

Sin querer estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que el efecto sinérgico resultante de la administración de IL15 en forma de proteína de fusión con ApoA resulta de la acción de IL15 en tejidos diana que expresan en su superficie receptores para ApoA, de forma que IL15 puede ejercer su efecto en tejidos distintos o complementarios a los que se pensaba hasta la fecha. Esta hipótesis se sustenta en que el efecto sinérgico se observa también en ratones delecionados para el gen del receptor α de IL15.

Composiciones de la invención

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende, juntos o separados,

- (i) un primer componente seleccionado del grupo de
 - (a) un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
 - (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
- (ii) un segundo componente seleccionado del grupo de
 - (a) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
 - (b) un polinucleótido que codifica IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
- (iii) un tercer componente seleccionado del grupo de
 - (a) el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo y
 - (b) un polinucleótido que codifica el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término “composición”, según se usa en la presente invención, se refiere a una composición de materia que comprende los componentes indicados, es decir, el polipéptido Apo A, IL15 y el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 así como cualquier producto resultante, directa o indirectamente, de la combinación de los distintos componentes en cualquier cantidad de los mismos. El experto en la materia apreciará que la composición puede venir formulada como una única formulación o puede presentarse como formulaciones de cada uno de los componentes por separado que pueden combinarse para su uso conjunto como una preparación combinada. La composición puede ser un kit de partes en donde cada uno de los componentes se formula y empaqueta de forma separada.

El término “proteína”, usado aquí indistintamente con polipéptido, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o por puentes disulfuro.

El término “polinucleótido”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como deoxiribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados mediante metilación o así como formas no modificadas. Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan indistintamente en la presente invención e incluyen mRNA, cDNA y polinucleótidos recombinantes. Según se usa en la presente invención, los polinucleótidos no están limitados a polinucleótidos tal y como aparecen en la naturaleza, sino que incluye polinucleótidos en los que aparecen análogos de nucleótidos y enlaces internucleotídicos no naturales. Ejemplos no limitantes de este tipo de estructuras no naturales incluyen polinucleótidos en los que el azúcar es distinto a la ribosa, polinucleótidos en los que aparecen enlaces fosfodiéster 3'-5' y 2'-5', polinucleótidos en los que aparecen enlaces invertidos (3'-3' y 5'-5') y estructuras ramificadas. Adicionalmente, los polinucleótidos de la invención incluyen enlaces internucleotídicos no naturales tales como péptidos ácidos nucleicos (PNA o peptide nucleic acids), ácidos nucleicos cerrados (LNA or locked nucleic acids), enlaces C1-C4 alquilfosfonato del tipo de metilfosfonato, fosforamidato, C1-C6 alquilfosfotriéster, fosfortioato y fosforoditioato. En cualquier caso, los polinucleótidos de la invención mantienen la capacidad de hibridar con ácidos nucleicos diana de forma similar a polinucleótidos naturales.

ES 2 362 062 A1

Primer componente de la composición de la invención

El primer componente de la invención se selecciona del grupo de un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma y un ácido nucleico que codifica un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término “polipéptido ApoA”, según se usa en la presente invención se refiere a cualquier miembro de la familia Apo A que forma parte de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y que es capaz de interactuar de forma específica con receptores en la superficie de las células hepáticas garantizando de esta manera su capacidad de vehiculizar a este órgano las moléculas de interés acopladas a dicha proteína Apo A. Preferiblemente, las moléculas de Apo A que pueden ser utilizadas en la presente invención se seleccionan del grupo de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-III, ApoA-IV y ApoA-V o de variantes funcionalmente equivalentes de las mismas.

En una forma preferida de realización, la proteína Apo A que se utiliza en la presente invención es la proteína ApoA-I. Por ApoA-I se entiende, en el contexto de la presente invención, la forma madura de la proteína pre-proApoA-I que forma parte de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La ApoA-I se sintetiza como un precursor (pre-proApoA-I) que contiene una secuencia señal de secreción que se elimina para dar lugar al precursor. La secuencia señal consta de 18 amino ácidos, el propéptido de 6 y la forma madura de la proteína de 243 amino ácidos. Preferiblemente se utiliza la forma madura de la proteína carente de péptido señal y procesada. En una forma preferida de realización, la proteína ApoA-I es de origen humano y su secuencia de amino ácidos es la mostrada en SEQ ID NO: 1 (número de acceso en UniProt P02647). En otra forma preferida de realización, la proteína ApoA-I es de origen murino, en particular de ratón, y su secuencia de amino ácidos es la mostrada en SEQ ID NO: 2 (número de acceso en UniProt Q00623). En otra forma preferida de realización, la proteína ApoA-I es de origen murino, en particular de rata, y su secuencia de amino ácidos es la mostrada en SEQ ID NO: 3 (número de acceso en UniProt P04639).

Por “variante funcionalmente equivalente de ApoA-I” se entiende todas aquellos polipéptidos que resultan de la inserción, sustitución o delección de uno o más amino ácidos de la secuencia de ApoA-I mencionada anteriormente y que mantienen sustancialmente intacta la capacidad de interactuar con el denominado “scavenger receptor de clase B tipo I” (SR-BI) que forma el receptor de HDL presente en las células hepáticas. La capacidad de interactuar con el receptor de HDL se determina esencialmente tal y como ha sido descrito por Monaco et al (EMBO J., 1987, 6:3253-3260) bien mediante estudios de unión de ApoA-I a las membranas de hepatocitos o bien mediante la determinación de la capacidad de ApoA-I o de su variante de inhibir la unión de HDL a los receptores de las membranas de los hepatocitos. Preferiblemente, la constante de disociación de la unión de la variante de ApoA-I a las membranas de hepatocitos es de al menos 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M o 10^{-4} M.

Variantes de ApoA-I contempladas en el contexto de la presente invención incluyen polipéptidos que muestran al menos 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, ó 95% de similitud o identidad con los polipéptidos de ApoA-I. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).

Preferiblemente, las variantes de ApoA-I utilizadas en el contexto de la invención presentan una vida media en suero elevada con respecto a las ApoA-I mencionadas anteriormente, lo que permite alcanzar niveles de ApoA-I en suero superiores a los que se observan con ApoA-I. Métodos para determinar la vida media de una proteína en suero y, en particular de ApoA-I, son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, usando los métodos basados en marcajes metabólicos con proteínas marcadas descritos por Eisenberg, S. et al (J. Lipid Res., 1973, 14:446-458), por Blum et al. (J. Clin. Invest., 1977, 60:795-807) y por Graversen et al (J Cardiovasc Pharmacol., 2008, 51:170-177). Un ejemplo de dicha variantes que muestra una mayor vida media es, por ejemplo, la variante denominada Milano (que contiene la mutación R173C).

El primer componente de la invención puede ser un ácido nucleico que codifica al menos una de las ApoA y variantes de Apo A mencionadas anteriormente. Así, en el caso de que el ácido nucleico codifique ApoA, este puede ser de origen humano correspondiente a la secuencia con número de acceso X02162 en NCBI (SEQ ID NO: 4), de origen murino correspondiente a la secuencia con número de acceso X64262 en NCBI (SEQ ID NO: 5), de rata correspondiente a la secuencia con número de acceso M00001 en NCBI (SEQ ID NO: 6).

El experto en la materia apreciará que el ácido nucleico que forma el primer componente de la invención debe de ser expresado en el interior de una célula y eventualmente secretado al medio, para lo cual, la secuencia que codifica ApoA o una variante funcionalmente equivalente de la misma puede presentar en un extremo 5' una secuencia que codifica una señal secretora. La expresión “secuencia señal secretora”, según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de amino ácidos que es capaz de promover el acceso a la vía secretora celular de todas aquellas proteínas que presentan dicha secuencia en su extremo N-terminal. Secuencias señal adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, entre otras, la secuencia señal de activador de plasminógeno tisular (tPA), de la hormona del crecimiento, GM-CSF y de las inmunoglobulina y, en particular, de Igκ o de IgVλ. Preferiblemente, la secuencia señal que forma parte del componente A de la invención es la propia secuencia señal de Apo A tal y como se definió anteriormente.

Alternativamente, el primer componente de la invención puede ser un ácido nucleico que muestra una identidad de secuencia de al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente en donde el porcentaje de identidad se determina mediante el uso de un algoritmo del tipo GAP, BESTFIT o FASTA cuya implementación informática aparece en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) y en el que se usan los algoritmos locales de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2:482), de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443) o de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1988, 85:2444) usando los valores por defecto para los distintos parámetros.

Alternativamente, el primer componente de la composición de la invención es un polinucleótido que codifica ApoA o una variante de la misma y que es capaz de hibridar específicamente con cualquiera de las secuencias correspondientes a ApoA nativas de distintos mamíferos definidas anteriormente. Por "polinucleótidos capaces de hibridar específicamente con un polinucleótido diana" se entiende, en el contexto de la presente invención, aquellos polinucleótidos que son capaces de hibridar en condiciones estrictas, entendiéndose por condiciones estrictas, las condiciones que permiten la hibridación específica de dos ácidos nucleicos a temperaturas de en torno a 65°C por ejemplo, en una solución de 6 X SSC, SDS al 0,5%, solución de Denhardt al 5% y ADN no específico desnaturalizado a una concentración de 100 µg/ml cualquier otra solución con una fuerza iónica equivalente y tras una etapa de lavado a 65°C en presencia de una solución de, por ejemplo SSC al 0,2% y SDS al 0.1% y cualquier otra solución con una fuerza iónica equivalente. No obstante, las condiciones estrictas pueden ser adaptadas por el experto en la materia en función del tamaño de la secuencia a ser hibridada, en función del contenido en GC y en función de otros parámetros. Métodos adecuados para la selección de las condiciones de hibridación adecuadas se han descrito por Sambrook y cols., 2001 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Segundo componente de la composición de la invención

El segundo componente de la invención se selecciona del grupo de IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y de un ácido nucleico que codifica IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término "IL15" o "IL-15", según se usa en la presente invención, se refiere a una citoquina cuyo aislamiento, clonaje y secuencia se describe en Grabstein *et al.* (US5747024 y Grabstein *et al.*, 1994, *Science* 246: 965-968). El término IL15 incluye cualquier forma polipeptídica con una secuencia de aminoácidos de una IL15 natural. Ejemplos de IL15 que pueden ser usados formando parte de las composiciones y proteínas de fusión de la presente invención incluyen, IL15 de roedores (ratón, rata, hámster), humana, primate, canina, felina, porcina, equina, bovina, ovina, y similares. Polipéptidos IL15 de mamíferos que pueden formar parte de las composiciones y proteínas de fusión de la invención incluyen, sin limitación, IL15 de origen humano y cuya secuencia de aminoácidos es la mostrada en P40933 (SEQ ID NO: 7); IL15 de ratón y cuya secuencia de aminoácidos es la mostrada en P48346 (SEQ ID NO: 8), IL15 de rata y cuya secuencia de aminoácidos es la mostrada en P97604 (SEQ ID NO: 9), IL15 de gato y cuya secuencia de aminoácidos es la mostrada en O97687 (SEQ ID NO: 10) e IL15 bovina cuya secuencia de aminoácidos es la mostrada en Q28028 (SEQ ID NO: 11).

Por "variante funcionalmente equivalente de IL15" se entienden todas aquellos polipéptidos que resultan de la inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos de la secuencia de cualquiera de las secuencias de IL15 mencionada anteriormente y que mantienen sustancialmente intacta al menos una de las funciones de IL15, en donde dicha función se selecciona de:

- la capacidad de promover la proliferación de células T CD8+ determinado, por ejemplo, mediante el método descrito por Montes, *et al.* (Clin. Exp. Immunol., 2005, 142:292-302) basado en la incubación de una población de células mononucleares de sangre periférica con un péptido antigénico en presencia de la variante de IL15 seguido de la determinación del porcentaje de células que pueden ser marcadas con anticuerpos específicos frente a CD8),
- la capacidad de promover la activación de células NK tras ser presentada en trans por las células dendríticas. Esta capacidad puede ser determinada mediante la medida de la incorporación de timidina tritiada por parte de las células NK CD56+ en presencia de IL15 o mediante la medida de la secreción por parte de las células NK de la citoquina GM-CSF. Métodos para determinar ambas funcionalidades de IL15 han sido descritos por Carson, W. *et al.* (J. Exp. med., 1994, 180:1395-1403), macrófagos y neutrófilos.
- La capacidad de IL15 de inhibir la apoptosis mediada por Fas en células precursoras de células B, tal y como ha sido descrito por Demirci *et al.* (Cell Mol Immunol. 2004, 1:123-8.), que puede ser determinado usando técnicas estándar de determinación de apoptosis tales como TUNEL o la determinación de la fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio.

Variantes de IL15 contempladas en el contexto de la presente invención incluyen polipéptidos que muestran al menos 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, ó 95% de similitud o identidad con los polipéptidos de IL15 de mamíferos mencionados anteriormente. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando

ES 2 362 062 A1

algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).

El segundo componente de la invención puede ser un ácido nucleico que codifica al menos una de las IL15 nativas y variantes de IL15 mencionadas anteriormente. Los ácidos nucleicos que codifican IL15 de mamíferos pueden ser recuperado de los repositorios de ácidos nucleicos e incluyen, sin limitación, polinucleótidos cuyas secuencias vienen definidas por los números de acceso U14407 (humana, SEQ ID NO: 12), U14332 (ratón, SEQ ID NO: 13), U69272 (rata, SEQ ID NO.14), AF108148 (gato, SEQ ID NO;15) y U42433 (bovina, SEQ ID NO: 16).

Dichos polinucleótidos incluyen aquellos que muestran una identidad de secuencia de al menos al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, la menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente en donde el porcentaje de identidad se determina mediante el uso de un algoritmo de entre los mencionados anteriormente.

Alternativamente, los polinucleótidos que forman el segundo componente de la invención son polinucleótidos capaces de hibridar de forma específica con los polinucleótidos definidos anteriormente. Métodos para determinar la capacidad de un polinucleótido de hibridar de forma específica con una secuencia diana se han descrito con detalle en el contexto del primer componente de la invención.

El experto en la materia apreciará que el ácido nucleico que forma el segundo componente de la invención puede encontrarse operativamente acoplado a una secuencia señal lo que permite la secreción al medio de la IL15 o de la variante funcionalmente equivalente. Secuencias señal adecuadas para su uso en la presente invención incluyen las mencionadas anteriormente en el contexto del primer componente de la composición de la invención. Preferiblemente, la secuencia señal que forma parte del segundo componente de la composición de la invención es la propia secuencia señal de IL15 tal y como se definió anteriormente o la secuencia señal de una las inmunoglobulina, en particular, de Ig κ o de IgV λ .

Tercer componente de la composición de la invención

El tercer componente de la invención se selecciona del grupo del dominio sushi de la cadena alpha del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

La expresión “dominio sushi de la cadena alfa del receptor de IL15” (en adelante IL15R α -sushi), según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de amino ácidos que aparece en la región extracelular de la cadena alfa del receptor de IL15 y que corresponde a la secuencia que comienza con la primera cisteína que aparece en el primer exón del gen de la cadena alfa del receptor de IL15 y que concluye con la cisteína codificada por el exón 4 del gen de la cadena alfa del receptor de IL15. Alternativamente, el dominio sushi se define como la secuencia que comienza en el primer resto de cisteína de la cadena alfa del receptor de IL15 tras la secuencia señal y que concluye con el cuarto resto de cisteína tras la secuencia señal en dicha secuencia. Dominios sushi adecuados para su uso en la presente invención incluyen el dominio sushi que procede de la cadena alfa del receptor de IL15 de origen humano, correspondiente a la secuencia con número de acceso NP_002180 en UniProt y cuyo dominio Sushi corresponde a la secuencia

CPPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA
TNVAHWTTPS LKC (SEQ ID NO:17)

y el dominio sushi que procede de la cadena alfa del receptor de IL15 de ratón correspondiente a la secuencia con número de acceso Q60819 en Swiss-Prot y cuyo dominio Sushi corresponde a la secuencia

CPPPV SIEHADIRVK NYSVNSRERY VCNSGFKRKA GTSTLIECVI NKNTNVAHWT
TPSLKC (SEQ ID NO:18);

Por “variante funcionalmente equivalente del dominio sushi de la cadena alfa del receptor de IL15” se entienden todos aquellos polipéptidos que resultan de la inserción, sustitución o delección de uno o más amino ácidos de la secuencia de cualquiera de las secuencias de los dominios sushi de origen humano o murino mencionadas anteriormente y que mantienen sustancialmente intacta la capacidad de unirse a IL15 y de incrementar el efecto proliferativo de IL15 en células que expresan el receptor de IL15 de baja afinidad (por ejemplo, células de la líneas Mo-7e o 32D β) tal y como ha sido descrito por Mortier *et al.* (J. Biol. Chem., 2006, 281:1612-1619).

Variantes de IL15R α -sushi contempladas en el contexto de la presente invención incluyen polipéptidos que muestran al menos 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, ó 95% de similitud o identidad con los polipéptidos mencionados anteriormente. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).

El tercer componente de la invención puede ser un ácido nucleico que codifica al menos un dominio sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 nativas y variantes del mismo mencionadas anteriormente. Los ácidos nucleicos que codifican IL15R α -sushi de mamíferos pueden ser recuperados a partir de las secuencias de las cadenas alfa correspondientes que se encuentran en los repositorios de ácidos nucleicos e incluyen, sin limitación, las secuencias que codifican IL15R α -sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 humano (números de acceso en NCBI corresponden a U31628, SEQ ID NO: 19) y de ratón (número de acceso en NCBI: U22339, SEQ ID NO: 20).

Dichos polinucleótidos incluyen aquellos que muestran una identidad de secuencia de al menos al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, la menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente en donde el porcentaje de identidad se determina mediante el uso de un algoritmo de entre los mencionados anteriormente.

Alternativamente, los polinucleótidos que forman el tercer componente de la invención son polinucleótidos capaces de hibridar de forma específica con los polinucleótidos definidos anteriormente. Métodos para determinar la capacidad de un polinucleótido de hibridar de forma específica con una secuencia diana se han descrito con detalle en el contexto del primer componente de la invención.

El experto en la materia apreciará que el ácido nucleico que forma el segundo componente de la invención puede encontrarse operativamente acoplado a una secuencia señal lo que permite la secreción al medio del dominio sushi o de su variante funcionalmente equivalente. Secuencias señal adecuadas para su uso en la presente invención incluyen las mencionadas anteriormente en el contexto del primer componente de la composición de la invención. Preferiblemente, la secuencia señal que forma parte del segundo componente de la composición de la invención es la propia secuencia señal de la cadena alfa del receptor de IL15 tal y como se definió anteriormente o la secuencia señal de una las inmunoglobulina, en particular, de Ig κ o de IgV χ .

En una forma preferida de realización, el tercer componente de las composiciones de la invención es un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia identificada como SEQ ID NO: 21 y que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi del receptor IL15RA humano, precedido de su propio péptido señal (SEQ ID NO: 22).

Las composiciones de la invención pueden estar formadas por polipéptidos o polinucleótidos procedentes de distintas especies. No obstante, en una realización preferida los tres componentes se originan de una misma especie animal. En una forma preferida de realización, los tres componentes son de origen humano. En otra forma preferida de realización, los tres componentes son de origen murino.

Composiciones en las que el primer y el segundo componente forman una única molécula

Los autores de la presente invención han observado que es posible obtener el efecto sinérgico sobre la actividad antitumoral de IL15 cuando el primer y el segundo componente de la composición de la invención forman parte de una única molécula. En este caso, las composiciones de la invención son composiciones binarias formadas por un primer componente que a su vez comprende el primer y segundo componente definidos anteriormente, y un segundo componente, que se corresponde al tercer componente definido anteriormente. El experto en la materia apreciará que si el primer y segundo componentes de la composición son polipéptidos, dicha única molécula es una proteína de fusión que comprende (i) un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma y (ii) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término "proteína de fusión", según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que comprenden dos o más regiones que proceden de proteínas distintas o heterólogas.

Alternativamente, en el caso de que tanto el primer como el segundo componentes de la composición sean polinucleótidos, dicha única molécula es un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende (i) un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo y (ii) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En este caso, cuando el primer y segundo componente son de naturaleza peptídica, la invención contempla composiciones en las que el primer componente se encuentra en posición N terminal con respecto al segundo componente y composiciones en las que el primer componente se encuentra en posición C terminal con respecto al segundo componente.

ES 2 362 062 A1

En el caso de que el primer y segundo componente sean de naturaleza polinucleotídica, la invención contempla composiciones en las que el primer componente se encuentra en posición 5' con respecto al segundo componente y composiciones en las que el primer componente se encuentra en posición 3' con respecto al segundo componente.

En ambos casos, es posible que el primer y segundo componente estén asociados directamente, esto es, que el extremo C-terminal del primer componente se encuentre asociado al extremo N-terminal del segundo componente o que el extremo C-terminal del segundo componente se encuentre asociado al extremo N-terminal del primer componente o que el extremo 3' del primer componente se encuentre asociado al extremo 5' del segundo componente y composiciones en las que el extremo 3' del segundo componente se encuentra asociado al extremo 5' del primer componente.

Alternativamente, en otro aspecto, la invención contempla composiciones en las que la fusión del primer y del segundo componente se lleva a cabo a través de un enlazador peptídico (en el caso de que el primer y segundo componente son de naturaleza polipeptídica) o de una secuencia que codifica un enlazador peptídico (en el caso de que el primer y segundo componente sean de naturaleza polinucleotídica).

El término "enlazador peptídico", "enlazador", "conector", "espaciador" o sus equivalentes gramaticales, según se usa en la presente invención, se refiere a una molécula que conecta dos moléculas y que frecuentemente permite que las moléculas conectadas adquieran una configuración funcional. El péptido enlazador preferiblemente comprende al menos dos aminoácidos al menos tres aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos diez aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos.

Enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen:

- Enlazadores que comprenden 2 aminoácidos o más seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina tales como, sin limitación, los enlazadores de secuencia SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 23), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 24), GGSGGAP (SEQ ID NO: 25) y GGGVEGGG (SEQ ID NO: 26) descritos por Muller, K.M. *et al.* ((Methods. Enzimology, 2000, 328: 261-281).
- Enlazadores basados en los residuos 53-56 de la tetranectina, que en la tetranectina forma una lámina β , y los residuos 57-59 que forman un giro en la tetranectina (Nielsen, B.B. *et al.*, FEBS Lett. 412: 388-396, 1997) tales como el enlazador de secuencia GTKVHMK (SEQ ID NO: 27),
- Enlazadores basados en una subsecuencia de la lámina de conexión 3 de la fibronectina humana, correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 tales como el enlazador PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 28) correspondiente a los aminoácidos número 2037-2049, y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 29) correspondiente a los residuos de aminoácidos 2038-2042 es más preferible.
- Enlazador basado en la secuencia de 10 residuos de aminoácidos de la región bisagra superior de la IgG3 murina tales como el enlazador de secuencia PKPSTPPGSS (SEQ ID NO: 30) que ha sido usado para la producción de anticuerpos dimerizados mediante una hélice enrollada (Pack P. y Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584).
- El péptido enlazador de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 31).
- El péptido enlazador de secuencia GGSGGGGSGGGGSLQ (SEQ ID NO: 32).
- El péptido enlazador de secuencia GAP.

Alternativamente, los dos componentes de los conjugados de la invención pueden estar conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de ApoA-I del componente (ii) Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enteroquinasa (sitio de corte DDDDK SEQ ID NO: 33), factor Xa (sitio de corte IEDGR, SEQ ID NO: 34), trombina (sitio de corte LVPRGS, SEQ ID NO: 35), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG, SEQ ID NO: 36), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFGP, SEQ ID NO: 37), inteínas y similares. En una forma preferida de realización, el sitio de corte es el de una proteasa que se expresa en tejidos tumorales, en tejidos inflamados o en hígado de forma que la separación de Apo A y del componente (ii) tenga lugar una vez que el conjugado ha llegado al hígado. En una forma preferida de realización, el enlazador contiene un sitio de reconocimiento de la metaloproteasa de matriz 9 (sitio de corte LFPTS, SEQ ID NO: 38).

Aunque la invención se ha ejemplificado con composiciones en las que tanto el componente resultante de la fusión de primer y segundo componente (la proteína de fusión de Apo A con IL15) como el tercer componente (el dominio Sushi de la cadena α del receptor de IL15) se emplean en forma de ácido nucleico, la invención no está limitada a composiciones en las que ambos componentes sean ácidos nucleicos sino que contempla, alternativamente, compo-

ES 2 362 062 A1

ciones en las que el primer y/o el segundo componente son polipéptidos. Así, la invención contempla composiciones formadas por:

- 5 - Un polipéptido que comprende una proteína de fusión formada por Apo A e IL15 y un polipéptido que comprende el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15.
- Un polipéptido que comprende una proteína de fusión formada por Apo A e IL15 y un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15.
- 10 - Un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una proteína de fusión formada por Apo A e IL15 y un polipéptido que comprende el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15.
- Un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una proteína de fusión formada por Apo A e IL15 y un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15.
15

La relación entre los componentes que forman parte de las composiciones de la invención dependerá del agente inductor de primer y segundo componente usado en cada caso en particular, así como de la indicación deseada. Así, la invención contempla composiciones en los que la relación entre las cantidades de los dos componentes puede oscilar entre 50:1 y 1:50, en particular entre 20:1 y 1:20, entre 1:10 y 10:1, ó entre 5:1 y 1:5.

En el caso de las composiciones en las que el primer y segundo componente formen una única molécula, cada uno de los componentes puede proceder de una especie distinta, aunque se prefiere que los componentes que forman una única molécula procedan de la misma especie. Así, en una forma preferida de realización, Apo A o la variante funcionalmente equivalente de la misma es de origen humano e IL15 o la variante funcionalmente equivalente de la misma es de origen humano. En otra forma preferida de realización, Apo A o la variante funcionalmente equivalente de la misma es de origen murino e IL15 o la variante funcionalmente equivalente de la misma es de origen murino.

30 En una forma preferida de realización, la molécula única que forma el primer componente de la composición está formada por el polipéptido ApoAI de origen humano e IL15 de origen humano, separados por un enlazador que presenta la secuencia GAP. El polinucleótido que codifica dicha fusión presenta una secuencia identificada en la presente invención como SEQ. ID. NO: 39.

35 En otra forma preferida de realización, la molécula única que forma el primer componente de la composición está formada por el polipéptido ApoAI de origen murino e IL15 de origen humano, separados por un enlazador que presenta la secuencia GAP. El polinucleótido que codifica dicha fusión presenta una secuencia identificada en la presente invención como SEQ. ID. NO: 40.

40 En otra forma preferida de realización, la molécula única que forma el primer componente de la composición está formada por el polipéptido ApoAI de origen murino e IL15 de origen murino, separados por un enlazador que presenta la secuencia GAP. El polinucleótido que codifica dicha fusión presenta una secuencia identificada en la presente invención como SEQ. ID. NO: 41.

45 El polipéptido que comprende el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o la variante funcionalmente equivalente del mismo puede ser de origen humano o de origen murino. No obstante, si los componentes que forman la molécula única son ambos de origen humano, se prefiere que el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o la variante funcionalmente equivalente del mismo sea también de origen humano. Alternativamente, si los componentes que forman la molécula única son ambos de origen murino, se prefiere que el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o la variante funcionalmente equivalente del mismo sea también de origen murino.

50

En otro aspecto, la invención contempla una proteína de fusión que comprende ApoA o una variante funcionalmente equivalente del mismo e IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Los términos "ApoA", "IL15", "variante funcionalmente equivalente de ApoA", "variante funcionalmente equivalente de IL15" han sido explicados en detalle con anterioridad y se emplean esencialmente de la misma manera en el caso de las proteínas de fusión.

55

Las proteínas de fusión pueden presentar el polipéptido ApoA en posición N-terminal con respecto a IL-15 o el polipéptido IL-15 en posición N-terminal con respecto a Apo A. Asimismo, ambos componentes pueden encontrarse unidos directamente o a través de un enlazador, que puede ser cualquiera de los enlazadores mencionados en la presente invención. Asimismo, los componentes pueden ser de origen humano o murino, de forma que la invención contempla fusiones de ApoA e IL15 de origen humano, fusiones de ApoA e IL15 de origen murino y fusiones de ApoA e IL15 en donde ApoA es de origen humano e IL15 es de origen murino y fusiones de ApoA e IL15 en donde ApoA es de origen murino e IL15 de origen humano.

60

65 En formas preferidas de realización, las proteínas de fusión de Apo A e IL15 corresponden a los polipéptidos con secuencia SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41.

ES 2 362 062 A1

Proteína de fusión de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende

- (i) una región A formada por un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- (ii) una región B formada por IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
- (iii) una región C formada por el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

La región A de la proteína de fusión coincide esencialmente con el primer componente de las composiciones de la invención por lo que ha sido descrito en detalle anteriormente.

La región B de la proteína de fusión coincide esencialmente con el segundo componente de las composiciones de la invención por lo que ha sido descrito en detalle anteriormente.

La región C de la proteína de fusión coincide esencialmente con el tercer componente de las composiciones de la invención por lo que ha sido descrito en detalle anteriormente.

El experto en la materia apreciará que la proteína de fusión de la invención puede presentar distintos ordenamientos de las regiones A, B y C. Así, la invención contempla:

- una proteína de fusión en la que la región A se encuentra en posición N-terminal, la región B se encuentra en posición central y la región C se encuentra en posición C-terminal,
- una proteína de fusión en la que la región A se encuentra en posición N-terminal, la región C en posición central y la región B en posición C-terminal,
- una proteína de fusión en la que la región B se encuentra en posición N-terminal, la región A se encuentra en posición central y la región C se encuentra en posición C-terminal,
- una proteína de fusión en la que la región B se encuentra en posición N-terminal, la región C se encuentra en posición central y la región A se encuentra en posición C-terminal,
- una proteína de fusión en la que la región C se encuentra en posición N-terminal, la región A se encuentra en posición central y la región B se encuentra en posición C-terminal y
- una proteína de fusión en la que la región C se encuentra en posición N-terminal, la región B se encuentra en posición central y la región A se encuentra en posición C-terminal.

Asimismo, las regiones A, B y/o C pueden encontrarse asociadas directamente, esto es, en donde el aminoácido C-terminal de una región se encuentra unido a través de un enlace peptídico con el aminoácido N-terminal de otra región. Alternativamente, las distintas regiones se encuentran unidas entre sí a través de un enlazador peptídico. Enlazadores adecuados para la proteína de fusión de la invención son esencialmente los mismos que se usan en la composición de la invención y han sido descritos en detalle anteriormente. El experto en la materia apreciará que la proteína de fusión puede contener uno o dos enlazadores peptídicos dependiendo de si únicamente dos de las tres regiones se encuentran asociadas entre sí a través de un enlazador o si las tres regiones se encuentran asociadas a través de enlazadores.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión presenta un ordenamiento del tipo C-B-A, es decir, comprende, en sentido N- a C terminal, el dominio Sushi de IL15R α (región C), IL15 (región B) y ApoAI (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO: 32). En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO: 32) y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP.

Aunque las proteínas de fusión de la invención se ejemplifican con proteínas de fusión en las que las regiones A, B y C son de origen murino, el experto en la materia apreciará que la invención contempla proteínas de fusión en donde cada una de las regiones A, B y C puede ser de un origen distinto de entre las distintas variantes de las regiones mencionadas anteriormente.

Así, en una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende una región A de origen humano o de origen murino, una región B de origen humano o de origen murino una región C de origen humano o de origen murino. En una forma aún más preferida, las tres regiones proceden del mismo organismo. Así, en una forma aún más preferida, las regiones A, B y C son de origen murino, En otra forma de realización preferida, las regiones A, B y C son de origen humano.

ES 2 362 062 A1

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión presenta un ordenamiento del tipo C-B-A en donde los tres componentes son de origen humano y en donde tanto las regiones C y B como las regiones B y A se encuentran conectadas por enlazadores peptídicos. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, en sentido N- a C-terminal, el dominio sushi de IL15R α humano (región C), IL15 humana (región B) y ApoAI humano (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ. En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende la secuencia definida por SEQ ID NO: 42.

En otra forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, en sentido N- a C terminal, el dominio sushi de IL15R α murino (región C), IL15 murino (región B) y ApoAI murino (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ. En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende la secuencia definida por SEQ ID NO: 43.

20 *Polinucleótidos, construcciones génicas, vectores y células hospedadoras de la invención*

En otro aspecto, la invención contempla un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención. Dado que la proteína de fusión de la invención ejerce su función desde el medio extracelular, es conveniente que el polinucleótido codifique una fusión de la proteína de fusión de la invención con una secuencia señal que permita el acceso de la proteína de fusión a la ruta secretora y la secreción al medio de la proteína de fusión. Secuencias señal adecuadas para su uso junto con la proteína de fusión incluyen tanto la secuencia señal de cualquiera de los componentes de la proteína de fusión (la secuencia señal de Apo A, la secuencia señal de IL15 o la secuencia señal de la cadena α del receptor de IL15) o cualquiera de las secuencias señal mencionadas anteriormente en el contexto del primer componente de la composición de la invención, es decir, secuencias señal adecuadas del activador de plasminógeno tisular (tPA), de la hormona del crecimiento, de GM-CSF y de las inmunoglobulinas y, en particular, las secuencias señal de Ig κ o de IgV χ .

En una forma preferida de realización, el polinucleótido de la invención comprende la secuencia identificada como SEQ. ID. NO. 44 que codifica una proteína de fusión o conjugado que comprende el dominio Sushi de origen humano, IL15 de origen humano y ApoA1 de origen humano, en donde el dominio Sushi e IL15 se encuentran separados por un enlazador de secuencia GGSGGGSGGGSGGGSLQ, en donde IL15 y ApoA1 se encuentran separados por un enlazador de secuencia GAP y en donde la fusión va precedida por la secuencia señal de la cadena alpha del receptor de IL-15 de origen humano.

En una forma preferida de realización, el polinucleótido de la invención comprende la secuencia identificada como SEQ. ID. NO. 45 que codifica una proteína de fusión o conjugado que comprende el dominio Sushi de origen murino, IL15 de origen murino y ApoA1 de origen murino, en donde el dominio Sushi e IL15 se encuentran separados por un enlazador de secuencia GGSGGGSGGGSGGGSLQ, en donde IL15 y ApoA1 se encuentran separados por un enlazador de secuencia GAP y en donde la fusión va precedida por la secuencia señal de la cadena alpha del receptor de IL-15 de origen murino.

El polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención puede encontrarse operativamente asociado a una región reguladora de la expresión dando lugar así a una construcción génica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende un polinucleótido de la invención. Preferiblemente, la construcción comprende el polinucleótido de la invención situado bajo el control operativo de secuencias que regulan la expresión del polinucleótido de la invención. El experto en la materia apreciará que los polinucleótidos de la invención deben acceder al núcleo de un tejido diana y allí transcribirse y traducirse para dar lugar a la proteína de fusión biológicamente activa.

En principio, cualquier promotor puede ser utilizado para las construcciones génicas de la presente invención siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que se desea expresar el polinucleótido. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NF κ B/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido.

ES 2 362 062 A1

Los polinucleótidos de la invención o las construcciones génicas que las constituyen pueden estar formando parte de un vector. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido o una construcción génica de la invención. El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas adecuadas o vectores de expresión en distintos organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores “shuttle” tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook *et al.*, 2001, citado *supra*).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 2001, citado *supra*). En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células huésped adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin estar limitado, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género Bacillus, Streptomyces y Staphylococcus y células de bacterias Gram negativas tales como células del género Escherichia y Pseudomonas. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de Drosophila y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

Métodos in vitro de la invención

Se ha descrito la capacidad de IL15 de promover la proliferación de linfocitos T sensibilizados por un antígeno. Así, se ha demostrado que la puesta en contacto de una población de linfocitos aislados previamente expuestos a un determinado antígeno con IL15 resulta en un aumento en la proliferación de los linfocitos. Esta población expandida de linfocitos puede ser utilizada en una inmunoterapia adoptiva para lo cual es posteriormente re-administrada al paciente del que se han obtenido dicha población inicial. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno que comprende poner en contacto una población de linfocitos previamente expuestos a dicho antígeno con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una construcción génica de la invención o una célula huésped de la invención.

La expresión “expansión” se usa en la presente invención indistintamente con proliferación y debe ser entendida como división celular o crecimiento celular. La expansión puede ser determinada usando métodos ampliamente conocidos como, por ejemplo, los métodos descritos en Transplantation (1999) 67: 605-613.

La expresión “linfocitos T específicos de un antígeno”, según se usa en la presente invención, se refiere a una población de linfocitos que es capaz de reconocer a un determinado antígeno. Típicamente, los linfocitos son aislados de un paciente que ha sido expuesto a dicho antígeno. Alternativamente, el antígeno puede ser puesto en contacto con la población de linfocitos en un sistema artificial de presentación antigénica tal y como ha sido descrito en las patentes estadounidenses US6828150 o US6787154.

El término “antígeno”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier sustancia que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en un sujeto que no es tolerante a dicho antígeno. El antígeno puede proceder del propio sujeto, en cuyo caso se trata de un autoantígeno, o puede ser un aloantígeno, es decir, un antígeno derivado de un individuo de la misma especie. Alternativamente, el antígeno puede ser un xenoantígeno, es decir, un antígeno derivado de un individuo de una especie diferente.

Los linfocitos que pueden ser usados en el método de la presente invención incluyen, sin limitación los linfocitos T citotóxicos (CTL), las células T helper, células activadas por linfoquinas, linfocitos que infiltran el tumor (TILS), las células NK, las células naive, las células de memoria, las células de gammadeltaT, las células NKT así como poblaciones celulares que comprenden cantidades variables de una o más de las células mencionadas anteriormente. En una forma preferida de realización, los linfocitos son CTL. Métodos adecuados para la obtención de CTLs para su posterior expansión *in vitro* usando el método de la invención son ampliamente conocidos para un experto en la materia e incluyen, sin limitación, el aislamiento a partir de sangre periférica, a partir de la sangre del cordón umbilical, a partir de tejidos que contiene linfocitos. En una forma preferida de realización, los linfocitos se aíslan mediante drenaje de ganglios linfáticos en pacientes que sufren una determinada enfermedad.

Una vez que se han aislado los linfocitos, estos son puestos en contacto con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una construcción génica de la invención o una célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para que se produzca la expansión de los linfocitos. Las condiciones generales para la expansión de CTL específicos de antígeno pueden ser establecidas de acuerdo a método conocidos [por ejemplo, Carter J. *et al.*, *Inmunología*, 57 (1), 123-129, (1996)] y pueden ser optimizadas de forma rutinaria por el experto en la materia. Típicamente, la puesta en contacto de los linfocitos con la composición, la proteína de fusión, el polinucleótido, el vector, la construcción génica o la célula huésped de la invención se lleva a cabo mediante el cultivo de los linfocitos en un medio adecuado para dichas células. Las células pueden ser cultivadas bajo condiciones convencionales en cualquier medio adecuado para hacer crecer linfocitos que incluyen un Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640. Con el fin de promover el crecimiento de las células, se pueden agregar factores necesarios para la proliferación y la viabilidad de éstos incluyendo suero, por ejemplo, suero de becerro fetal o suero humano y antibióticos, por ejemplo, penicilina, estreptomycin. Los linfocitos se mantienen bajo condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada de alrededor de 37°C y una atmósfera, por ejemplo, aire más 5% de CO₂.

En una forma preferida de realización, los linfocitos pueden ser tratados previamente a la estimulación con los compuestos de la invención para promover su activación *in vitro*, para lo cual los linfocitos se ponen en contacto con el antígeno frente al que son específicos. Esto es particularmente necesario en el caso de pacientes con tumores que producen sustancias inmunosupresoras. Para ello, es necesario estimular el cultivo de linfocito con el antígeno adecuado. Típicamente, el antígeno es presentado a la célula T de tal forma que la señal es disparada en la célula T a través del complejo TCR/CD3. Preferiblemente, el antígeno se puede presentar a la célula T mediante una célula que presenta antígeno.

La expresión “célula presentadora de antígeno”, según se usa en la presente invención, se refiere a una célula que contribuye a la generación de la respuesta inmune mediante la presentación de antígeno a los linfocitos T. Las células presentadoras de antígeno incluyen células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B o células de Langerhans. Las células presentadoras de antígeno pueden ser aisladas, por ejemplo, de la médula ósea, de la sangre, del timo, de la epidermis, del hígado o del hígado fetal.

En el caso de que el antígeno sea un antígeno tumoral, es posible usar un extracto de tumor autólogo y/o un antígeno de tumor recombinante. En el caso de un antígeno procedente de un patógeno, la activación de los linfocitos previa a su expansión se puede llevar a cabo usando una célula infectada con un patógeno, por ejemplo un virus que presenta antígenos del patógeno.

En el método para la expansión de CTL específicos de antígeno de la presente invención, es preferible que el tratamiento de las células con las composiciones, proteínas de fusión de la invención sea llevado a cabo en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y, preferiblemente, con un anticuerpo anti-CD3 monoclonal humano, y más preferentemente con OKT3. La concentración de los anticuerpos anti-CD3 durante el proceso de expansión no es especialmente limitado, y es, por ejemplo, 0,001 a 100 mg/mL, y más preferentemente 0,01 a 100 mg/mL. Adicional o alternativamente, las células pueden ser más co-cultivadas con un anticuerpo anti-CD28, y más preferiblemente con un anticuerpo anti-CD28 monoclonal humano. Adicional o alternativamente, las células se pueden co-cultivar con un factor estimulante de los linfocitos, como una lectina. Además, uno o más estos componentes se puede inmovilizar a una fase sólida.

Además, en el método para la expansión de CTLs antígeno-específicos de la presente invención, las células pueden ser co-cultivadas con células alimentadoras de acuerdo con las circunstancias. En principio, no existe limitación en cuanto al tipo de células alimentadoras que pueden ser usadas siempre y cuando dichas células alimentadoras cooperen con la proteína o composición de la invención o con los agentes mencionados en el párrafo anterior en la capacidad de promover la proliferación de CTLs. Preferiblemente, células alimentadoras adecuadas incluyen, sin limitación, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células EBV-B autólogas o no autólogas. Normalmente, las células de alimentación son tratadas una vez que se han utilizado para eliminar su capacidad de proliferación, preferiblemente mediante tratamiento con rayos X o con agentes citotóxicos como la mitomicina.

La actividad citotóxica de la población de linfocitos obtenida mediante el método de la invención puede ser determinada usando métodos conocidos. Por ejemplo, es posible determinar la capacidad de los linfocitos de provocar la lisis de una célula diana marcada y determinar la liberación del material marcado. Alternativamente, la actividad citotóxica puede ser determinada mediante la determinación del nivel de citoquinas (por ejemplo, GM-CSF e IFN- γ) producidas por los linfocitos o por la célula diana. Alternativamente, la actividad citotóxica puede ser determinada mediante la puesta en contacto de los linfocitos con un anticuerpo específico de linfocitos citotóxicos marcados con una primera molécula fluorescente y con un complejo formado por el péptido antigénico y el complejo mayor de histocompatibilidad marcado con una segunda molécula fluorescente seguido de la detección de células marcadas con ambas moléculas mediante citometría de flujo.

Las poblaciones de linfocitos expandidas de acuerdo a los métodos de la presente invención son particularmente útiles para su uso en inmunoterapia adoptiva, es decir, para la re-administración a sujetos que requieren una mayor respuesta inmune frente a un determinado antígeno. Preferiblemente, los linfocitos T se usan de forma autóloga, es decir, se re-administran al sujeto del que fueron extraídos originalmente.

Composiciones farmacéuticas de la invención

Las composiciones, polinucleótidos y proteínas de fusión de la invención resultan de utilidad para el tratamiento de enfermedades que requieren una dosis prolongada de IL15. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición, una proteína de fusión, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula hospedadora de acuerdo a la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000) Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

Alternativamente, las composiciones y compuestos de la invención pueden formularse como nanolipopartículas en aquellos casos en la composición comprende una proteína ApoIA o una fusión de ApoA y un segundo componente (IL15 o dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15) o en aquellos casos en los que la invención contempla una proteína fusión que comprende Apo A, IL15 y el dominio sushi de IL15RA). La formación de nanolipopartícula se basa que ApoA es el componente mayoritario de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

En el contexto de la presente invención, el término "nanolipopartícula" es equivalente a los términos "lipoproteína" o "partícula de lipoproteína" y pueden emplearse indistintamente. Por nanolipopartícula se entiende cualquier partícula hidrosoluble, formada por un núcleo de lípidos apolares (tales como colesterol esterificado y triglicéridos) cubiertos con una capa externa polar formada por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre.

Las nanolipopartículas o lipoproteínas se clasifican en función de su densidad en quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDs), lipoproteínas de densidad intermedia (IDLs), lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y lipoproteínas de alta densidad (HDLs). Las diferentes características de las lipoproteínas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Densidad (g/mL)	Clase	Diámetro (nm)	% proteína	% colesterol	% fosfolípido	% triacilglicerol
>1.063	HDL	5-15	33	30	29	8
1.019-1.063	LDL	18-28	25	50	21	4
1.006-1.019	IDL	25-50	18	29	22	31
0.95-1.006	VLDL	30-80	10	22	18	50
<0.95	quilomicrones	100-1000	<2	8	7	84

En una realización más particular, la nanolipopartícula es una lipoproteína de tipo HDL caracterizada por presentar una composición como la indicada en la tabla anterior y porque, las apolipoproteínas que forman la fracción proteica son la Apo A, Apo C, Apo D y Apo E.

Las nanolipopartículas pueden obtenerse mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, las nanolipopartículas pueden obtenerse *in vitro* mediante la adición de colesterol y fosfatidilcolina a la proteína de fusión tal como se describe en Lerch *et al.* (Vox Sang, 1996, 71: 155-164) o *in vivo* mediante el empleo de un animal no-humano que expresa en el hígado el conjugado de la invención dando lugar a la formación de nanolipopartículas que son secretadas al suero, de donde pueden ser aisladas.

En el caso de que la composición farmacéutica de la invención comprenda ácidos nucleicos (los polinucleótidos de la invención, los vectores o las construcciones génicas), la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugadas a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. *et al.*, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, Mol. Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). Alternativamente, el polinucleótido puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en retrovirus, tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

En otra forma de realización, las composiciones, proteínas de fusión y polinucleótidos de la invención se administran mediante la llamada "administración hidrodinámica" según ha sido descrito por Liu, F., *et al.*, (Gene Ther, 1999, 6:1258-66). Según dicho método, los compuestos se introducen en el organismo por vía intravascular a alta velocidad y volumen, lo que resulta en unos elevados niveles de transfección con una distribución más difusa. Se ha demostrado que la eficacia del acceso intracelular depende de forma directa del volumen de fluido administrado y de la velocidad de la inyección (Liu *et al.*, 1999, Science, 305:1437-1441). En ratones, la administración se ha optimizado en valores de 1 ml/10 g de peso corporal en un periodo de 3-5 segundos (Hodges *et al.*, 2003, Exp. Opin. Biol. Ther, 3:91-918). El mecanismo exacto que permite la transfección celular *in vivo* con polinucleótidos tras su administración hidrodinámica no es del todo conocido. En el caso de ratones, se piensa que la administración por la vena de la cola tiene lugar a un ritmo que excede el ritmo cardiaco, lo que provoca que el fluido administrado se acumule en la vena cava superior. Este fluido accede posteriormente a los vasos en los órganos y, posteriormente, a través de fenestraciones en dichos vasos, accede al espacio extravascular. De esta forma, el polinucleótido entra en contacto con las células del órgano diana antes de que se mezcle con la sangre reduciendo así las posibilidades de degradación por nucleasas.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 ó 0,00001 mg por cada kg de peso corporal y menos de 200 nmol de agente, es decir, en torno a 4.4×10^{16} copias por kg de peso corporal o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15 ó 0,075 nmol por Kg de peso corporal. La

ES 2 362 062 A1

5 dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica. Las composiciones y polinucleótidos bifuncionales de la invención pueden ser administradas directamente en el órgano en el que se exprese el ARNm diana en cuyo caso se administran dosis de entre 0,00001 mg a 3 mg por órgano, o preferiblemente entre 0,0001 y 0,001 mg por órgano, en torno a 0,03 y 3,0 mg por órgano, en torno a 0,1 y 3,0 mg por órgano o entre 0,3 y 3,0 mg por órgano.

10 La dosis depende de la severidad y respuesta de la condición a tratar y puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de agente en el organismo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de EC50 obtenidos mediante ensayos previos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con dosis que oscilan entre 0,01 μg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un tiempo que variará según el tipo de alteración que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o si se debe disminuir la dosis en caso de observar una mejora de la enfermedad o efectos secundarios indeseados.

20 La dosis diaria se puede administrar en una única dosis o en dos o más dosis según las circunstancias particulares. Si se desea una administración repetida o administraciones frecuentes, es aconsejable la implantación de un dispositivo de administración tal como una bomba, un catéter semipermanente (intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un reservorio.

25

Usos terapéuticos de las composiciones y proteínas de fusión de la invención

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere también a las composiciones, proteínas de fusión y polinucleótidos de la invención para su uso en medicina.

35 Las composiciones de la invención son capaces de promover la proliferación de linfocitos CD8 intraesplénicos, hepáticos y de sangre periférica *in vivo* (véase ejemplo 5 de la invención), presentan efecto antitumoral en distintos modelos de adenocarcinoma colorectal (véase ejemplos 6 y 7) y muestran efecto antimetastásico (véanse ejemplo 8). Estos efectos junto con las evidencias de la capacidad de IL15 de promover la actividad de células NK permiten el uso de los compuestos y composiciones de la invención en el tratamiento de pacientes que puedan beneficiarse de una estimulación de la respuesta inmune innata (mediada por células NK) o adaptativa (mediada por linfocitos CD8).

40 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, o una célula huésped de la invención para su uso en la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.

45 Preferiblemente, la composición de la invención, la proteína de fusión de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector o la construcción génica de la invención, o la célula huésped de la invención se usan para el tratamiento de enfermedad que requiera una activación del sistema inmune en respuesta a un antígeno.

50 Alternativamente, la invención se relaciona con el uso de una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, o una célula huésped de la invención para la preparación de un medicamento para la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno o para el tratamiento de enfermedad que requiera una activación del sistema inmune.

55 Alternativamente, la invención se relaciona con un método para promover la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno o para el tratamiento de una enfermedad que requiera una activación del sistema inmune que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector o una construcción génica de la invención, o una célula huésped de la invención.

60 La expresión “estimulación de la respuesta inmune de un sujeto”, según se usa en la presente invención, se refiere a la iniciación de una respuesta inmune contra un antígeno determinado en un individuo en donde dicha respuesta tiene lugar por primera vez como la reactivación de la respuesta inmune en sujetos en donde dicha respuesta inmune ya ha tenido lugar. Se entiende que la respuesta inmune puede implicar tanto una respuesta inmune innata como adaptativa, y puede implicar una respuesta de tipo humoral como celular.

65 Por tanto, la capacidad de los compuestos y composiciones de la invención de aumentar la respuesta inmune de un sujeto a un determinado antígeno puede ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades asociadas a la presencia de dicho antígeno en el organismo, lo que incluye enfermedades causadas por infecciones virales si se trata de un antígeno viral, enfermedades causadas por infecciones bacterianas si se trata de un antígeno bacteriano, enfermedades causadas por infecciones fúngicas si se trata de un antígeno fúngico, alergias si se trata de un alérgeno, enfermedades causadas

por una infestación parasitaria si se trata de un antígeno parasitario y/o un tumor si se trata de un antígeno específico de células tumorales. Por tanto, en formas preferidas de realización, la enfermedad que requiere una activación del sistema inmune se selecciona del grupo de una enfermedad infecciosa y una enfermedad neoplásica.

5 Enfermedades causadas por infecciones virales que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por la infecciones por el virus VIH-1 (SIDA), por el herpesvirus humanos tales como el virus del herpes simple (herpes simple, herpes genital), citomegalovirus (mononucleosis, retinitis, hepatitis), el virus de Epstein Barr (mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo) y el virus de la varicela zóster (varicela, herpes zóster); por los virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C, por paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano; flavivirus tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o el virus de la encefalitis japonesa) y rotavirus. Otro tipo de infecciones virales que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la presente invención se describen en detalle en Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991).

Enfermedades causadas por infecciones bacterianas que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por microorganismos del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus* o *Bordetella*.

Enfermedades causadas por infecciones fúngicas que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, meningitis criptocócica y similares.

Infestaciones parasitarias que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, paludismo, infección por *Pneumocystis jiroveci*, neumonía, enfermedad del sueño, leishmaniosis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosoma.

Trastornos de tipo alérgico que pueden ser tratados con los compuestos y composiciones de la invención incluyen, sin limitación, alergias causadas por exposición al polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alergias causadas por exposición a alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), a alérgenos de la caspa y del pelo de animales y a alérgenos de la comida.

Los conjugados y composiciones de la invención también son adecuados para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas. La expresión “enfermedad proliferativa”, según se usa en la presente invención, se refiere a enfermedades que están causadas o resultan de niveles inapropiadamente altos de división celular, de niveles inapropiadamente bajos de apoptosis o de ambos e incluye tanto tumores primarios como metástasis. El término “tumor primario” se refiere a un tumor que se encuentra en el sitio primario en el que se originó dicho tumor. El término “metástasis”, según se usa en la presente invención, se refiere al proceso por el que un tumor se extiende a tejidos del organismo distintos al sitio primario de origen del tumor.

En el contexto de la invención, se entiende por “tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa” o “tratamiento de un tumor” la administración de los compuestos y composiciones de la invención para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o con radioterapia.

El cáncer que va a tratarse en el contexto de la presente invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Estos tumores o cáncer incluyen, y no se limitan a, neoplasias ubicadas en colon, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, hipófisis, testículos, ovarios, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y aparato genitourinario y, más particularmente, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer hepatocelular en adultos (primario), cáncer de hígado en adultos (primario), leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, enfermedad de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no de Hodgkin en adultos, cáncer de hígado en adultos primario, sarcoma del tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, tumores malignos relacionados con el SIDA, cáncer de ano, astrocitoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario), leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tallo cerebral infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma de la vía óptica y e hipotalámico infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no de Hodgkin infantil,

tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rabdomiosarcoma infantil, sarcoma del tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de la vía óptica infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma de células T cutáneo, carcinoma de células de los islotes del páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer de páncreas exocrino, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragadales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, cáncer de mama en la mujer, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer hipofaríngeo, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer pancreático de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama en el hombre, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer metastásico escamoso de cuello primario, cáncer metastásico escamoso de cuello, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin durante el embarazo, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma-Z fibroso maligno, osteosarcoma-W histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, paraproteinemias, púrpura, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de hígado primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, sarcoidosis, sarcomas, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma del tejido blando, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores pineales y neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer tiroideo, cáncer de la pelvis renal y uréter de células de transición, cáncer de pelvis renal y uréter de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, glioma hipotalámico y de la vía óptica, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, ubicada en un sistema de órgano enumerado anteriormente.

Composiciones vacunales de la invención

Los compuestos y composiciones de la invención son útiles también como adyuvantes en vacunas para aumentar la respuesta de un paciente a un antígeno. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición vacunal que comprende un antígeno y una composición, una proteína de fusión, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula hospedadora de acuerdo a la invención.

El término “vacuna” o “composición vacunal”, según se usa en la presente invención, se refiere a una composición que comprende al menos un antígeno de interés y que permite activar la respuesta inmune de un sujeto a dicho antígeno. El objetivo de las vacunas es activar la inmunidad tanto mediada por células como por anticuerpos. Preferiblemente, la inmunidad mediada por células incluye la estimulación de una respuesta de células T, principalmente, una respuesta mediada por CD4 +, y/o una respuesta de las células T CD8 +.

El término “adyuvante”, según se usa en la presente invención, se refiere a un agente inmunológico que es capaz de activar el sistema inmune permitiendo obtener una respuesta inmune de mayor intensidad y más eficiente a una vacuna que la que se obtendría como resultado de administrar la vacuna sin adyuvante. Respuestas adyuvantes típicas incluyen, sin limitación, la activación, proliferación y/o diferenciación de células del sistema inmune (células B, células T, células dendríticas, células presentadoras de antígeno, macrófagos, células NK), aumento o disminución en la expresión de marcadores y citoquinas, estimulación de los títulos de IgA, IgM y/o IgG, esplenomegalia (aumento de la celularidad esplénica), hiperplasia, formación de infiltrados en distintos órganos y otro tipo de respuestas que pueden ser cuantificadas por el experto en la materia usando tecnología estándar.

Así, las vacunas que pueden ser usadas en combinación con las combinaciones y compuestos de la invención incluyen vacunas que presentan uno o más antígenos seleccionados del grupo de un antígeno viral, un antígenos bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o un antígeno medioambiental y un antígeno tumoral.

Antígenos virales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen antígenos del VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humanos, (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos) o proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como gB o derivados de los mismos), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de los mismos), virus de la varicela zóster (tales como gp1, II, III y IE63), o de un virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos de núcleo, E1, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, de virus de la rubeola (tales como proteínas E y

E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humanos (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, eg L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células infectadas con virus influenza, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus), y similares (véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales).

Antígenos bacteriales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen antígenos de *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PiC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (tales como adhesinas e invasinas de alto y de bajo peso molecular); antígenos de *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *Parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina de la tosferina o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSP10, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD de 19kDa [Rv3763], PPD de 38kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a la toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas del clostridium A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana exterior poco comunes), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; antígenos de *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*.

Antígenos de derivados de levaduras tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*; antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDa, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3 (documento EP 366 412) y posibles proteínas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico neumolisina, y derivados detoxificados mutantes de los mismos); antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no clasificable (tales como OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria, o variantes de múltiples copias o las proteínas de fusión de las mismas); antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* (tales como RTS.S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestri-na, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*).

Antígenos fúngicos adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, componentes de antígeno fúngico de *Candida*; antígenos fúngicos de *Histoplasma* tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígeno fúngico de *Histoplasma*; antígenos fúngicos de criptococos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígeno fúngico de criptococos; antígenos fúngicos de coccidios tales como antígenos de esférula y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios; y antígenos fúngicos de *Tinea* tales como tricofitina y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios.

Antígenos protozoarios adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como antígenos

de superficie de merozoitos, antígenos de superficie de esporozoitos, antígenos de circumsporozoitos, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno de estadio en sangre pf, 55/RESA y otros componentes de antígenos de plasmoides; antígenos de *Toxoplasma* tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígeno de *Toxoplasma*; antígenos de esquistosoma tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de esquistosoma; el antígeno de *Leishmania* y otros antígenos de *Leishmania* tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígeno de *Leishmania*; y antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígeno de *Trypanosoma*.

Alérgenos o antígenos medioambientales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y el pelo de animales, y alérgenos de la comida. Alérgenos del polen importantes de árboles, césped y hierbas se originan a partir de órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales*, *Pinales* y *Platanaceae* incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* and *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, pájaros, alérgenos de veneno incluyendo los que se originan de picaduras o mordeduras de insectos tales como los del orden taxonómico de *Hymenoptera* incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas y hormigas (superfamilia *Formicoidae*). Todavía otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

Antígenos tumorales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA bp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, γ -catenina, p120ctn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p21ras), cáncer biliar (p21ras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p21ras), carcinoma de colon (p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100Pme1117), mieloma (familia MUC, p21ras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítomos del VLTH-1).

Los componentes de las composiciones de la invención, en concreto, la fusión de APO A e IL15 o el polinucleótido que codifica dicha fusión y el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o el ácido nucleico que codifica dicho dominio pueden presentarse como una única formulación (por ejemplo, como un comprimido o cápsula que comprende una cantidad fija de cada uno de los componentes) o, por el contrario, puede presentarse como formulaciones separadas para posteriormente combinarlos para su administración conjunta, secuencial o separada. Las composiciones de la invención también contemplan la formulación como un kit-de-partes en donde los componentes se formulan separadamente pero se empaquetan en un mismo contenedor.

El experto en la materia apreciará que la formulación del primer y segundo componente de las composiciones de la invención pueden ser similares, es decir, formulados de manera semejante (por ejemplo, en comprimidos o en tabletas), lo que permite su administración por la misma vía. En una realización en la que los distintos componentes de la invención se formulan separadamente, los dos componentes se pueden presentar en blíster. Cada blíster contiene los medicamentos que tienen que ser consumidos a lo largo de un día. Si los medicamentos tienen que ser administrados

varias veces al día, se pueden disponer los medicamentos correspondientes a cada administración en distintas secciones del blíster, preferiblemente anotando en cada sección del blíster el momento del día en el que deben ser administrados. Alternativamente, los componentes de la composición de la invención pueden ser formulados de forma distinta de manera que los distintos componentes se administren de forma distinta. Así, es posible, por ejemplo, que el primer componente se formule como comprimido o cápsula para su administración oral y que el segundo componente se formule para su administración intravenosa.

Las composiciones de la invención se administran mediante los métodos conocidos para un experto en la materia, incluyendo, sin limitación, intravenosa, oral, nasal, parenteral, tópica, transdérmica, rectal y similares.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que tienen un carácter meramente ilustrativo y no limitativo del ámbito de la invención.

15 Ejemplos

Ejemplo 1

Origen y construcción de los plásmidos

1.1 Extracción de RNA

El RNA total de hígado de ratón fue aislado de muestras individuales usando TRI reagent (Sigma, Madrid, España). La concentración y pureza de las muestras fue determinada por la absorbancia a 260 y 280 nm con corrección de fondo a 320 nm en espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf).

1.2 RT-PCR síntesis de cDNA total

El RNA total (3µg) fue tratado con DNasa I y retrotranscrito a cDNA con M-MLV RT en la presencia de RNase OUT (todos los reactivos de Invitrogen, Carlsbed, CA). Se obtuvieron 25 µl de cDNA total de hígado. La reacción fue incubada 1 h a 37°C, desnaturalizada 1 min a 95°C y llevada a 4°C. Las muestras fueron usadas inmediatamente para PCR o almacenadas a -20°C.

1.3 Clonaje de cDNA de la Apolipoproteína A-I murina (mApoA1) y obtención del plásmido pCMV-mApoA1

pCMV-mApoA1 (pApo), comprende una secuencia SEQ. ID. NO. 1 que codifica un polipéptido que comprende la apolipoproteína A-I (ApoA1) murina precedida por su propio péptido señal, y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus;

Se diseñó el cebador sentido FwATGmApoA1: 5'-ATGAAAGCTGTGGTGTGCTGGC-3' (SEQ. ID. NO. 46),

y el cebador antisentido RvTGmApoA1: 5'-TCACTGGGCAGTCAGAGTCT-3' (SEQ. ID. NO. 47).

Se amplificó el cDNA de mApoA1 (795 nucleótidos totales, 72 nucleótidos codificantes para el péptido señal y 723 nucleótidos codificantes para la proteína nativa) mediante PCR sobre el cDNA total de hígado, usando BioTaq DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido): 5 min 94°C, 30 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 55°C y 40 seg a 72°C, seguido de 7 min a 72°C en termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). El producto de PCR fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El cDNA purificado de mApoA1 fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante, en el vector de expresión pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pCMV-mApoA1 o también pApo. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

1.4 Clonaje de cDNA de Interleuquina 15 humana (hIL15) y obtención del plásmido pCMV-hIL15

pCMV-hIL15 (phIL15), comprende una secuencia SEQ. ID. NO. 2 que codifica un polipéptido que comprende la IL15 humana precedida por el péptido señal de la cadena IgV λ , y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus;

Se diseñó el cebador sentido FwAscIhIL15: 5'-AATAATGGCGCGCCGAAGTGGATAGATG-3' (SEQ. ID. NO. 48),

que introduce la secuencia de 9 nucleótidos (GGCGCGCCC) que constituye un sitio de restricción para la enzima AscI en 5';

ES 2 362 062 A1

y el cebador antisentido RvNotIhIL15: 5'-GTTCATCAACACGTCCTGAGCGGCCGC-3' (SEQ. ID. NO. 49),

que introduce la secuencia de 8 nucleótidos (GCGGCCGC) que constituye un sitio de restricción para la enzima NotI en 5'.

Se amplificó el cDNA de hIL15 (345 nucleótidos totales) mediante PCR sobre el plásmido de expresión pVkl/IL-15IRESneo (Meazza *et al.* Eur. J. Immunol. 1997; 27: 1049-1054). Este plásmido contiene la secuencia codificante de la IL15 madura humana precedida de la cadena IgV χ , bajo el control del promotor del citomegalovirus. Se usará el término pCMV-hIL5 o pHIL15 para referirse a él.

La PCR se realizó usando EasyA high fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene, Cedar Creek, TX, EEUU). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min 95°C, 30 ciclos de 40 seg a 95°C, 30 seg a 57°C y 45 seg a 72°C, seguido de 7 min a 72°C en termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems Foster City, EE.UU.). El producto de PCR fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El cDNA purificado de hIL15 fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas, en el vector de expresión pTrcHis2 TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pTrcHis2-hIL15. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

1.5 Construcción del plásmido pCMV-Apo-hIL15 (pApo-hIL15) que codifica la fusión génica de mApoA1 y hIL15

pCMV-Apo-hIL15 (pApo-hIL15), comprende una secuencia SEQ. ID. NO. 40, que codifica una proteína de fusión que comprende la apolipoproteína A-I murina, unida a la IL15 humana mediante un enlazador GAP (*linker*), y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus; y

Se diseñó el cebador antisentido RvAscImApoA1: 5'-GGCGCGCCCTGGGCAGTCAGAGTCTCGC-3' (SEQ. ID. NO. 50),

que introduce la secuencia de 9 nucleótidos (GGCGGCC) que constituye un sitio de restricción para la enzima AscI en 3' del gen ApoA1 y elimina el codón de terminación. Esta secuencia de restricción añadida se traducirá en un péptido de unión corto GAP, que dará cierta movilidad a las proteínas constituyentes.

Se amplificó por PCR, usando como molde el pCMV-mApoA1 (ver ejemplo 1.3), y los cebadores FwATGmApoA1 y RvAscImApoA1, con la enzima BioTaq DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido), 5 min 94°C, 30 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 57°C y 40 seg a 72°C, seguido de 7 min a 72°C en termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems Foster City, EE.UU.). El producto de PCR (804 nucleótidos) fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado de mApoA1-AscI fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas, en el vector de expresión pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pCMV-mApoA1-AscI. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

Paralelamente usando como molde el pTrcHis2-hIL15 (ver ejemplo 1.4) se digirió 50 min a 37°C con la enzima AscI y Buffer 4 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado AscI-hIL15- pTrcHis2 fue seguidamente digerido 50 min a 37°C con la enzima NotI, 1xBSA y Buffer 3 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), obteniendo el DNA purificado AscI-hIL15-NotI (345 nucleótidos).

Para realizar la fusión génica el plásmido pCMV-mApoA1-AscI se digirió 50 min a 37°C con la enzima AscI y Buffer 4 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado pCMV-mApoA1 fue seguidamente digerido 50 min a 37°C con la enzima NotI, 1xBSA y Buffer 3 (New England Biolabs) aprovechando el sitio de restricción presente en el esqueleto del pcDNA 3.1 V5-His TOPO[®] TA. El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Se ligó el vector abierto por AscI y NotI pCMV-mApoA1 con el inserto AscI-hIL15-NotI en un ratio 1:3 (vector: inserto) usando la ligasa T4 DNA ligase High Concentration y como solución tampón el 2X Rapid Ligation Buffer (Promega Madison, WI, U.S.A.), incubando la mezcla 10 min a temperatura ambiente. Se transformaron posteriormente bacterias Top10 (Invitrogen, Carlsbed, CA). Las bacterias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en placas de Petri con medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias positivas mediante la técnica de MiniPrep (Qiagen, Alemania) para, posteriormente, digerir 2 μ g de dicho plásmido con las enzimas AscI/PmeI (New England Biolabs) y separar por electroforesis el resultado de dicha digestión en un gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia del inserto. El plásmido resultante de 6669 nts se denominará en adelante pCMV-Apo-hIL15 o también pApo-hIL15.

1.6 Origen del plásmido pSushi

El plásmido que en el contexto de esta invención denominamos pCMV-Sushi (pSushi) se corresponde con el plásmido IL-15RΔMD descrito previamente por Duitmann y cols. (Duitman, E.H., *et al.*, Mol Cell Biol, 2008; 28: 4851-4861), que fue amablemente proporcionado por los autores de este trabajo.

pCMV-Sushi (pSushi), que contiene una secuencia SEQ. ID. NO. 20 que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi de la cadena α de receptor de la IL15 murino (IL15ra), precedido por un péptido señal de Ig κ , y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus.

Ejemplo 2

Modelos experimentales

2.1 Animales

Los experimentos han sido realizados en ratones inmunocompetentes BALB/c y C57BL/6 hembras entre 5-7 semanas (Harlan, Barcelona, Spain). Se utilizaron ratones “knock-out” para el gen IL15R α (Lodolce *et al.* IL15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9: 669-676). Los animales fueron tratados según normas éticas de experimentación animal, bajo condiciones específicas libres de patógenos externos.

2.2 Manipulación animal

Cada plásmido de DNA (10 μ g) fue resuspendido en 1,8 ml de suero salino 0,9% (Braun) introducido por la vena de la cola mediante inyección hidrodinámica, usando agujas 27.5G y jeringuillas 2.5 ml (Becton-Dickinson, España). Se obtuvieron muestras de sangre por vía retroorbital, previa anestesia vía inhalatoria con isoflurano (Forane, Abbott). El suero fue recuperado mediante dos centrifugaciones consecutivas a 9,1xg durante 5 minutos y almacenados a -20°C. La anestesia parenteral se realizó por inyección intraperitoneal de 200 μ l/ratón con una mezcla 9:1 de ketamina (Imalgene) y xilacina (Rompun).

2.3 Líneas celulares

La línea celular CT26 deriva de un adenocarcinoma colorectal de ratón BALB/c y fue inducida por el carcinógeno N-nitroso-N-metil-uretano.

La línea MC38 proviene de un adenocarcinoma murino.

Ambas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 completo (Gibco-BRL, Paisley, UK), suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS) inactivado a 56°C, glutamina 2 mM, estreptomina 100 U/ml, penicilina 100 mg/ml, 1% β -mercaptoetanol 5.10⁻³. Las células descritas fueron cultivadas en cámaras incubadoras humidificadas a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO₂. Las placas y botellas de cultivo son de Greiner Bio-one (Essen, Alemania).

2.4 Determinación de hIL15

Los niveles séricos de hIL15 se midieron por ELISA en placas 96 pocillos planos NUNC maxisorp. Con un kit de ELISA (Set Human IL15, BD Biosciences, San Diego, CA, EEUU), según las instrucciones provistas por el fabricante.

2.5 Citometría de flujo

El estudio de las poblaciones celulares se realizó por medio de citometría de flujo. Para ello se partió de sangre obtenida por vía retroorbital, del bazo y el hígado de los animales. Los órganos sólidos se incubaron durante 15 min con una solución de colagenasa y DNasa para facilitar la disgregación celular, que se llevó a cabo con la ayuda de un Cell Strainer[®] (BC Falcon, Bedford, MA, EEUU). Los linfocitos hepáticos se aislaron mediante centrifugación de la suspensión celular en una disolución de Percoll[®] (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) al 35%. Para cada hígado se utilizaron los siguientes reactivos: 1,6 mL de PBS 10X, 15,8 mL de Percoll[®], 200U de Heparina (Mayne Pharma, Madrid, España) y 28 mL de RPMI (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU).

Todas las suspensiones celulares estudiadas fueron tratadas con búfer Tris NH₄Cl durante 5 minutos para lisar los eritrocitos.

Las células fueron resuspendidas en 50 μ L de PBS y se incubaron durante 10 min a 4°C en oscuridad con la mezcla de anticuerpos correspondientes. Posteriormente se realizaron dos lavados y se analizaron en un citómetro

ES 2 362 062 A1

FACScalibur® (BD Bioscience, San Diego, CA, EEUU). El análisis posterior de los datos se realizó con el programa Flow Jo Versión 5.7.2.

Los anticuerpos usados fueron NK1.1-PE, CD3-FITC, CD8-PE, CD44-APC, CD62L-PE, CD8-PECy7 y NK1.1-APC (BD-Pharmamingen, BD Bioscience, San Diego, CA, EEUU).

2.6 Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa informático Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Los datos de aparición tumoral se representaron en gráficos de Kaplan-Meier. Los datos estudiados a distintos tiempos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni. Se consideraron valores significativos $p < 0,05$.

Ejemplo 3

Niveles circulantes de hIL15 tras administración hidrodinámica de construcciones plasmídicas

Para estudiar los niveles de hIL15 humana en suero de ratón, se dispusieron grupos de 2-3 ratones y se administró a cada ratón 10 μg del correspondiente plásmido (o combinación de plásmidos) mediante inyección hidrodinámica. Los plásmidos inyectados a los diferentes grupos fueron: pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, pHIL15, pHIL15 + pSushi, pApo ó vehículo salino (S).

Se obtuvieron muestras de suero a las 8, 24, 96, 168 y 240 horas y se determinó la concentración de hIL15 en ellos mediante un ELISA sándwich. Los sueros de los ratones que recibieron el plásmido control que expresa la ApoA1 no contenían niveles detectables de hIL15 (Figura 1). Los ratones que habían sido inyectados con el plásmido que expresa hIL15 presentaron concentraciones máximas de hIL15 a las 8 h que disminuían rápidamente (Figura 1). En cambio, los ratones que recibieron los plásmidos que codifican para el ApoA1-hIL15 (con o sin coinfección del plásmido pSushi) presentaron concentraciones más altas de hIL15 sérica a las 8 h, que siguieron aumentando hasta las 24 h. A las 168 h se podía detectar hIL15 en los ratones tratados con pApo-hIL15 por contraposición a los que se observa ratones inyectados con pHIL15 (Figura 1). Por lo tanto, las construcciones que expresan las proteínas de fusión ApoA1-hIL15 consiguen niveles circulantes superiores y más duraderos de hIL15.

En conclusión, la administración hidrodinámica del plásmido pApo-hIL15 induce altas concentraciones de hIL15 sérica muy superiores a la producida por la administración de pHIL15.

Ejemplo 4

Ensayo funcional en células CTLL2

Para estudiar los efectos farmacodinámicos del plásmido pApo-hIL15 se realizó un ensayo funcional con células CTLL2 que requieren IL-2 o IL15 para proliferar (Meazza *et al.* Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1049-1054).

Se administraron los plásmidos mediante inyección hidrodinámica y se obtuvieron muestras de suero a las 24 h. El suero se descomplementó mediante desnaturalización térmica (45 minutos 56°C) y se añadió a cultivos de células CTLL2. Durante 48 h y se midió con timidita tritiada la proliferación celular. La concentración de hIL15 en el suero se midió mediante un ELISA sándwich comercial. En términos de cantidades equimolares de hIL15, el suero del ratón tratado con pApo-hIL15 + pSushi indujo una proliferación más intensa de las células CTLL2 (Figura 2).

Por tanto se concluye que la coadministración del plásmido pSushi con pApo-hIL15 aumenta su efecto biológico. Las construcciones plasmídicas de ApoA1 fusionada con hIL15 presentan un mayor efecto inductor de la proliferación de células CTLL2 que cuando son administradas junto a un plásmido que codifica el dominio sushi (pSushi) de IL15R α .

Ejemplo 5

Estimulación de proliferación de linfocitos CD8

Para estudiar la posible actividad inmunoestimuladora de las construcciones expresadas en el hígado mediante inyección hidrodinámica, en primer lugar se analizó el aumento del número de linfocitos T CD8 en el bazo. Para ello, se inyectaron los plásmidos mediante inyección hidrodinámica y 3, 4, 5, 6 y 7 días más tarde, se disgregaron los bazos para obtener una suspensión unicelular, se contaron las células totales y, tras marcar los linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD44 se analizaron mediante citometría de flujo de múltiples colores. La

inyección conjunta de los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi aumentó el número de linfocitos T CD8 del bazo en mayor medida que el resto de los tratamientos (Figura 3A). Lo mismo ocurrió con el número de linfocitos T CD8 memoria determinados como células CD3+, CD8+, CD44hi (Figura 3C). El porcentaje de células T CD8 y CD8 memoria respecto a los esplenocitos totales también fue superior en el grupo de los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi si se comparan con el resto de los grupos (Figuras 3B y 3D).

Se analizó también el porcentaje de linfocitos T CD8 respecto a los linfocitos presentes en el hígado de los ratones tratados con los diferentes plásmidos. Para ello, se inyectaron los plásmidos mediante inyección hidrodinámica y a día 3, 4, 5, 6 y 7 se disgregaron los hígados, se aislaron los linfocitos mediante centrifugación en una solución de Percoll® y, tras marcar los linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8, se analizaron mediante citometría de flujo. Los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi conjuntamente presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8 en el hígado superior a los ratones del resto de los grupos (Figura 4).

Posteriormente se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8 respecto a los linfocitos presentes en sangre periférica de los ratones tratados con los diferentes plásmidos. Para ello, se inyectaron los plásmidos mediante inyección hidrodinámica y a día 3, 4, 5 y 6 se obtuvieron muestras de sangre y se marcaron los linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD44 y anti-CD62L. Se analizaron mediante citometría de flujo. Los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi conjuntamente presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8 en sangre periférica superior a los ratones del resto de los grupos los días 5 y 6 después del tratamiento (Figura 5A). También se observó un porcentaje mayor de linfocitos T CD8 memoria (CD8+ CD44+) en este grupo (Figura 5B) y dentro de las subpoblaciones de células T CD8 efectoras memoria (CD8+ CD44+ CD62L-) y CD8 centrales memoria (CD8+ CD44+ CD62L+) (Figuras 5C y 5d).

Los estudios del número y porcentaje de linfocitos T CD8 demuestran que la administración de pApo-hIL15 y pSushi induce poblaciones más abundantes de linfocitos T CD8 en bazo, hígado y sangre periférica que la administración de los otros plásmidos. Específicamente, la administración de pApo-hIL15 y pSushi resulta en una población significativamente mayor de linfocitos T CD8 en bazo, hígado y sangre que la administración de las construcciones pHIL15 y pSushi.

Ejemplo 6

Efecto antitumoral de las construcciones basadas ApoA1 y hIL15 en el modelo de CT26 subcutáneo

Para estudiar el efecto antitumoral de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 inyectadas mediante inyección hidrodinámica, se eligió un modelo de tumor subcutáneo en ratones Balb/c inducido por la línea celular CT26 deriva de un adenocarcinoma colorectal. Se inyectaron 5×10^5 células por ratón por vía subcutánea y se trataron a los 3 días con las diferentes construcciones basadas en ApoA1, hIL15 y Sushi. Se midió el tamaño de los tumores calculando el producto de 2 diámetros 2 veces por semana con un calibre digital. Los ratones se sacrificaron cuando su tamaño era superior a 246 mm^2 .

En el grupo de ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi se observó un retraso en el crecimiento de los tumores que no resultó estadísticamente significativo (Figura 6A). El 25% de los ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi sobrevivió los 50 días de la inoculación del tumor y no presentaban tumor visible (Figura 6B). El 14% de los ratones tratados con el plásmido pApo sobrevivió, al igual que el 11% de los ratones tratados con pApo-hIL15. Ningún ratón de los otros grupos de tratamiento sobrevivió al tumor. Estos datos indican que el tratamiento con pApo-hIL15 y pSushi tiene ciertos efectos antitumorales en el modelo de tumor subcutáneo CT26.

Ejemplo 7

Efecto antitumoral de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en el modelo de MC38 subcutáneo

Para continuar el estudio del efecto antitumoral de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 se eligió otro modelo de tumor subcutáneo. En ratones C57B16 se inyectaron 5×10^5 células de la línea MC38 por vía subcutánea y se trataron a los 6 días con las diferentes construcciones basadas en ApoA1, hIL15 y Sushi a los ratones portadores de nódulos tumorales. Se midió el tamaño de los tumores calculando el producto de 2 diámetros 2 veces por semana con un calibre digital y los ratones se sacrificaron cuando su tamaño era superior a 246 mm^2 .

En el grupo de ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi se observó un retraso en el crecimiento de los tumores que no resultó estadísticamente significativo (Figura 7a). El 37,6% de los ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi sobrevivió los 64 días de la inoculación del tumor y no presentaban tumor visible (Figura 7b). El 16,7% de los ratones tratados con el plásmido pApo sobrevivió, al igual que el 40% de los ratones tratados con pApo-hIL15, 17% de los tratados con pHIL15 y el 33% de los que recibieron únicamente vehículo salino (S). Ningún ratón del grupo de pHIL15 + pSushi sobrevivió.

Estos datos indican que el tratamiento con pApo-hIL15 y pSushi tiene ciertos efectos antitumorales en el modelo de tumor subcutáneo MC38.

ES 2 362 062 A1

Ejemplo 8

Efecto antimetastásico de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en el modelo de MC38 intraesplénico

5 Se continuó el estudio del efecto antitumoral de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 con un modelo de inyección intraesplénica de las células tumorales que produce metástasis hepáticas.

10 En ratones C57B16 se inyectaron 5×10^5 células de la línea MC38 por ratón por vía intraesplénica y se trataron al día siguiente con las diferentes construcciones basadas en ApoA1, hIL15 y pSushi.

15 A los 19 días se sacrificaron los ratones y se observó el número de metástasis presentes en el hígado. De acuerdo con el número de metástasis los ratones se agruparon en 3 grupos: I ratones fallecidos debido a las metástasis hepáticas masivas o con metástasis generalizada (no es posible ver tejido sano en el hígado a simple vista); II ratones que presentan metástasis en parte del tejido hepático; III ratones libres de metástasis hepática.

20 En el grupo de ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi un 71% presentó un hígado libre de metástasis, frente al 30% de ratones tratados con pApo-hIL15, el 25% en tratados con pHIL15 + pSushi, 20% de los que recibieron salino (S) y 0% de los grupos de pHIL15 y pApo (Figura 8).

De estos datos se concluye que la administración de pApo-hIL15 y pSushi tiene efectos antimetastásicos más eficientes que el resto de las construcciones estudiadas en el modelo de tumor MC38 intraesplénico.

Ejemplo 9

Efecto de la administración de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en ratones "knock out" para el receptor α de IL15

30 Se continuó el estudio de los efectos inmunoestimuladores de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en ratones carentes del receptor α de IL15. Estos ratones presentan un fenotipo característico, ya que carecen de células NK y tienen una pequeña cantidad de células T CD8 memoria (Lodolce *et al. Immunity* 1998; 9: 669-676).

35 El objetivo de este experimento fue observar si pApo-hIL15 y pSushi podían modificar este fenotipo. Se inyectaron cuatro ratones, uno con los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi, otro con pHIL15 y pSushi, otro con pApo y finalmente otro con pApo-hIL15. A los cinco días se sacrificaron los ratones, se extrajo el bazo y se estudiaron las poblaciones esplénicas de células NK y linfocitos T CD8 memoria mediante citometría de flujo (Figura 9).

40 Los ratones tratados con los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi presentó un porcentaje de células NK de 1,02%, muy superior al del ratón tratado con pApo (0,39%). En cuanto a los linfocitos T CD8 memoria, de aquellos ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi tenía un 1,47% de células CD8+ CD44+ respecto al total de los esplenocitos. Este porcentaje es similar al alcanzado con la construcción pApo-hIL15 sola. Este experimento indica que el tratamiento con las construcciones pApo-hIL15 y pSushi recupera parcialmente el fenotipo de los ratones "knock out" para el receptor α de IL15, obteniendo porcentajes esplénicos de células NK y T CD8 memoria superiores a los obtenidos con el resto de construcciones estudiadas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende, juntos o separados,

- 5 (i) un primer componente seleccionado del grupo de
- (a) un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA y
- 10 (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA y
- (ii) un segundo componente seleccionado del grupo de
- 15 (a) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 y
- (b) un polinucleótido que codifica IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 y
- 20 (iii) un tercer componente seleccionado del grupo de
- (a) el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 y
- 25 (b) un polinucleótido que codifica el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15.
- 30

2. Una composición según la reivindicación 1 en donde el primer y segundo componente forman parte de una única molécula y en donde

- 35 a. si el primer y segundo componentes son polipéptidos, dicha única molécula es una proteína de fusión que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA, e IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15, y
- 40 b. si el primer y segundo componentes son polinucleótidos, dicha única molécula es un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA, e IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15.
- 45

3. Una composición según la reivindicación 2 en donde el ordenamiento del primer y segundo componente en dicha única molécula se selecciona del grupo consistente en

- 50 a. el primer componente se encuentra en posición N terminal o 5' con respecto al segundo componente y
- b. el primer componente se encuentra en posición C terminal o 3' con respecto al segundo componente.

55 4. Una proteína de fusión que comprende

- (i) una región A formada por un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido APO A,
- 60 (ii) una región B formada por IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 y
- (iii) una región C formada por el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15.
- 65

ES 2 362 062 A1

5. Una proteína de fusión según la reivindicación 4 en donde el ordenamiento de las regiones A, B y C en sentido N- a C- terminal en dicha proteína de fusión se selecciona del grupo consistente en A-B-C, A-C-B, B-A-C, B-C-A, C-A-B y C-B-A.
- 5 6. Una proteína de fusión según las reivindicaciones 4 ó 5 en donde al menos una de las uniones entre las regiones A, B y C se establece a través de un enlazador peptídico.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en donde
- 10 a. Apo A o la variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con Apo A es de origen humano o de origen murino,
- 15 b. IL15 o la variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 es de origen humano o de origen murino y/o
- 20 c. el polipéptido que comprende el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 es de origen humano o de origen murino.
8. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
9. Un vector o una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 8.
- 25 10. Una célula huésped que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, un vector según la reivindicación 9 o una construcción génica según la reivindicación 9.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, un vector o una construcción génica según la reivindicación 9 o una célula huésped según la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Método in vitro para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno que comprende poner en contacto una población de linfocitos previamente expuestos in vivo a dicho antígeno con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, un vector o una construcción génica según la reivindicación 9 o una célula huésped según la reivindicación 10.
- 40 13. Método según la reivindicación 12 en donde los linfocitos se someten previamente a una activación in vitro mediante la puesta en contacto de los linfocitos con el antígeno al que han sido expuestos dichos linfocitos T.
- 45 14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, un polinucleótido según la reivindicación 8, un vector o una construcción génica según la reivindicación 9 o una célula huésped según la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, de una enfermedad de tipo alérgico o de una enfermedad neoplásica.
- 50 15. Uso según la reivindicación 14, en donde la enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica o una enfermedad parasitaria.
- 55 16. Uso según la reivindicación 14, en donde la enfermedad neoplásica se selecciona del grupo que consiste en un tumor y una metástasis.
- 60
- 65

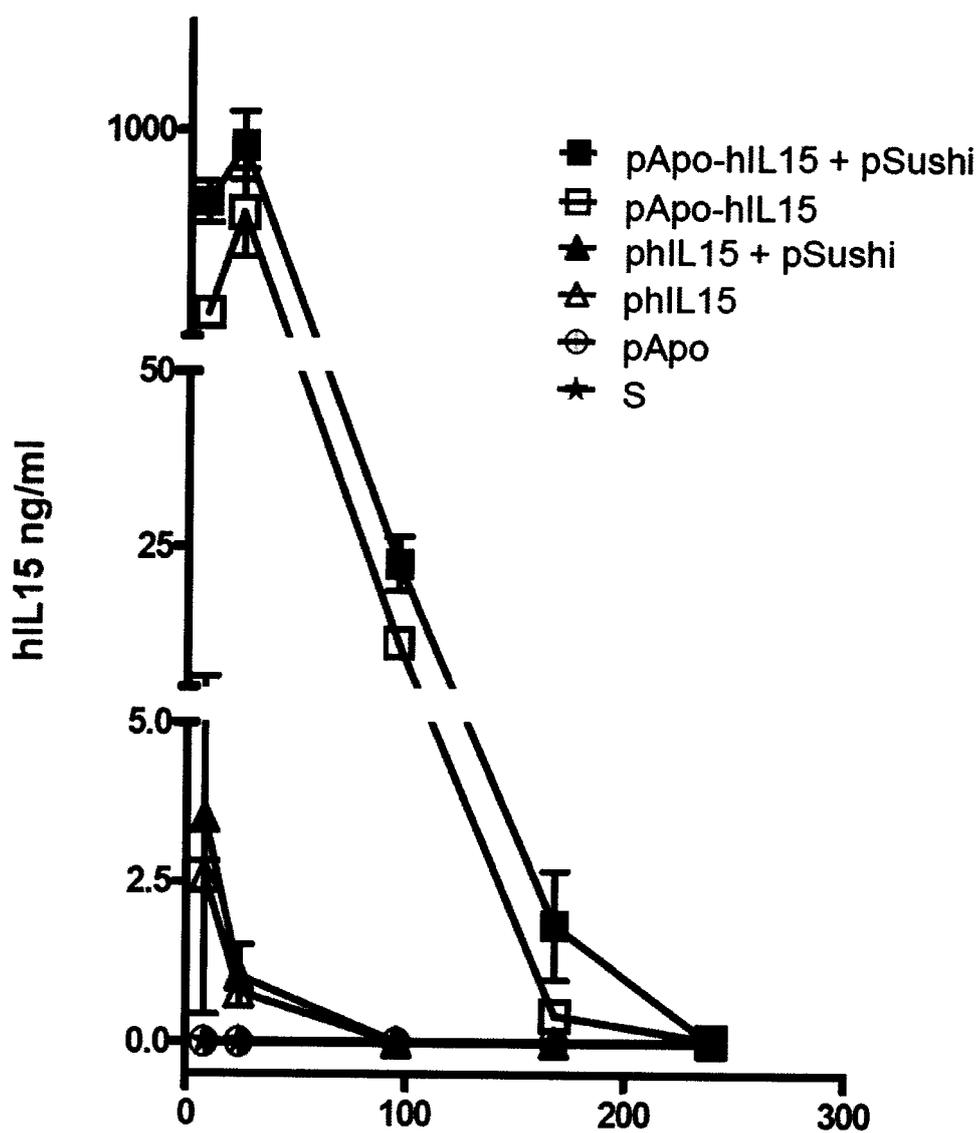


FIGURA 1

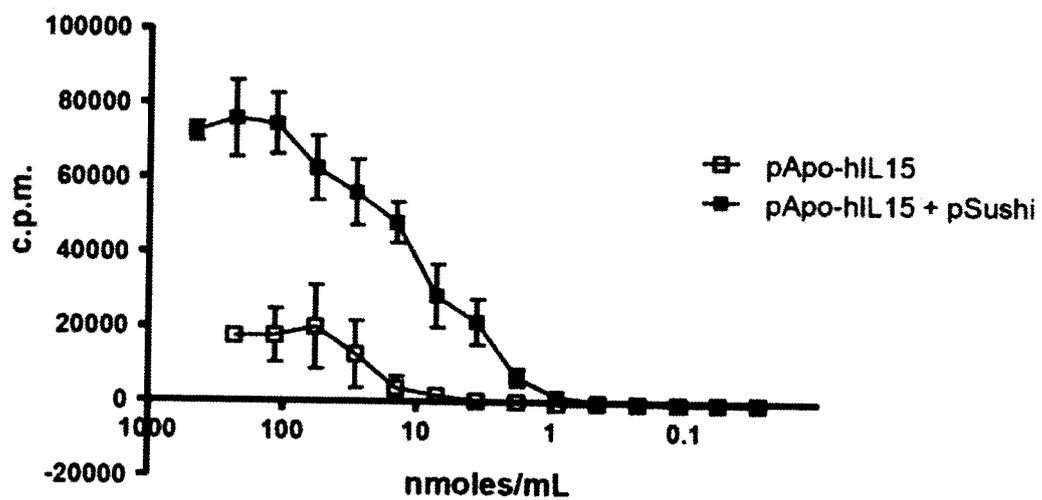


FIGURA 2

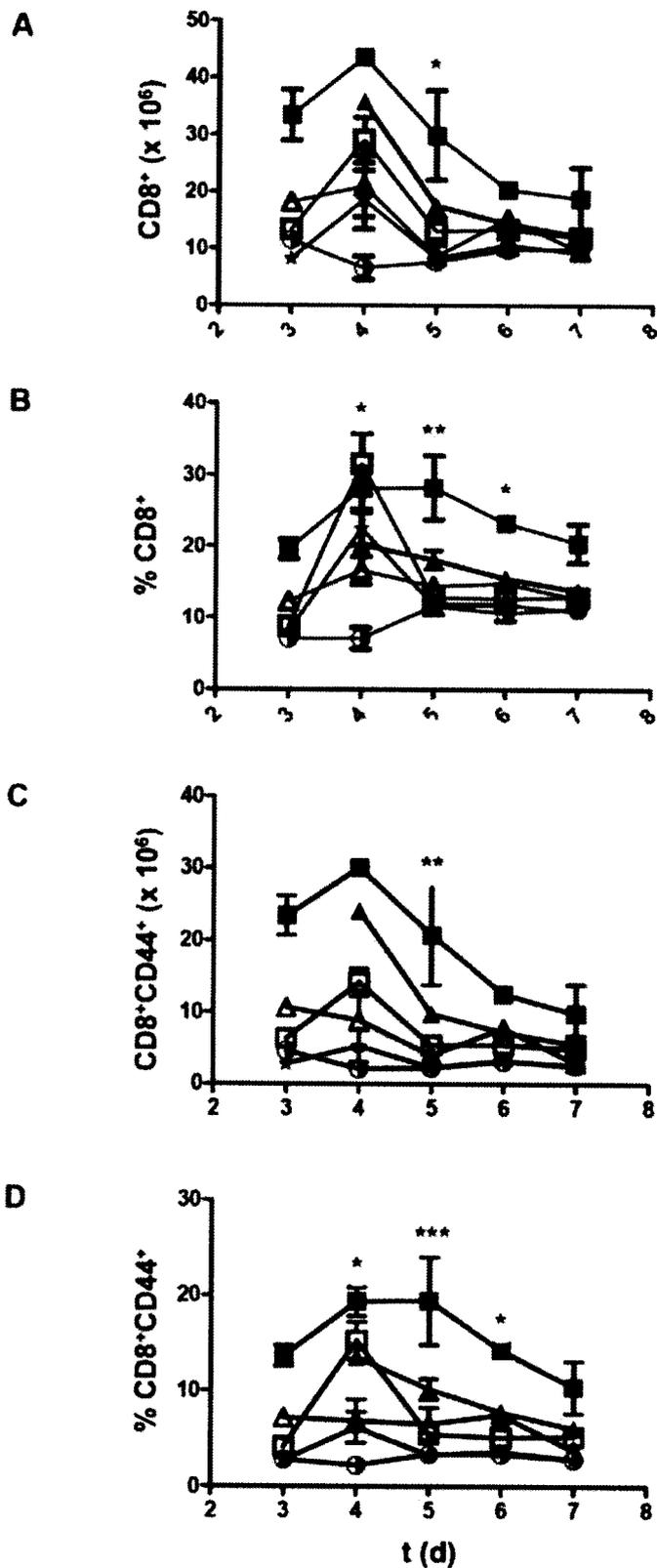


FIGURA 3

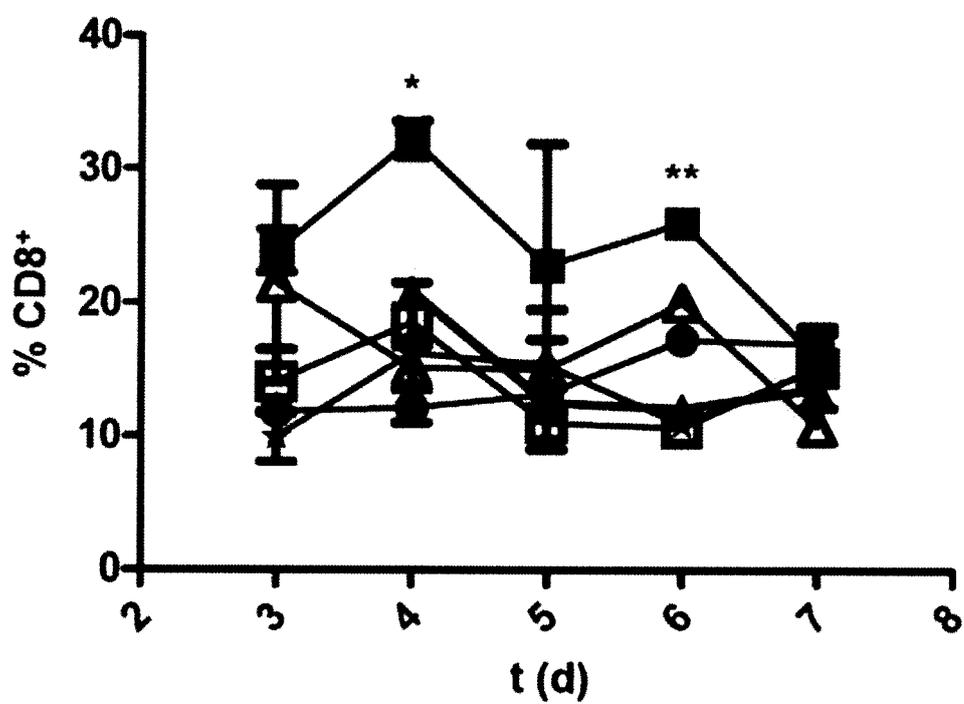


FIGURA 4

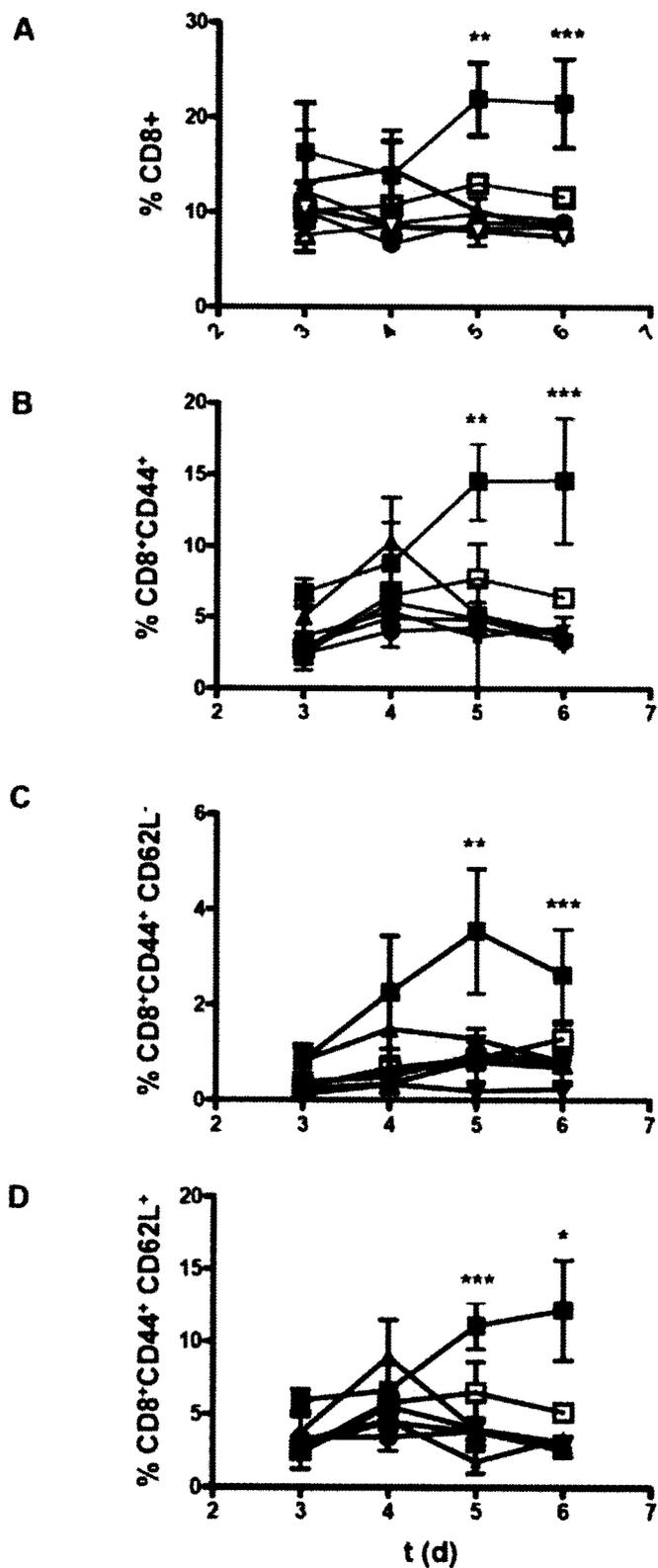


FIGURA 5

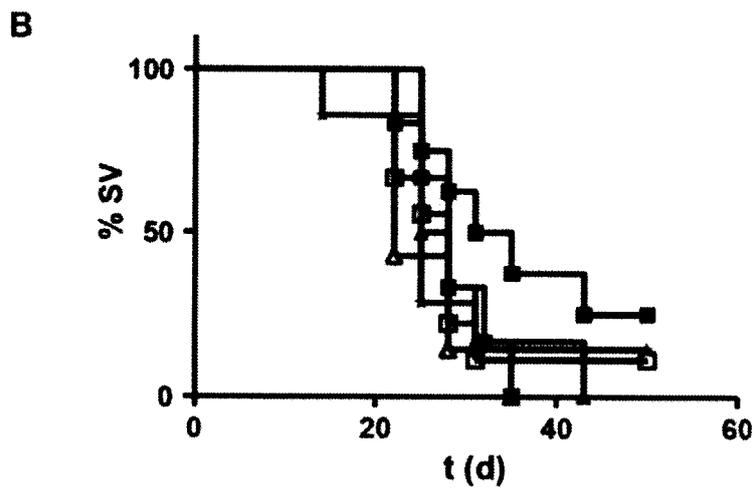
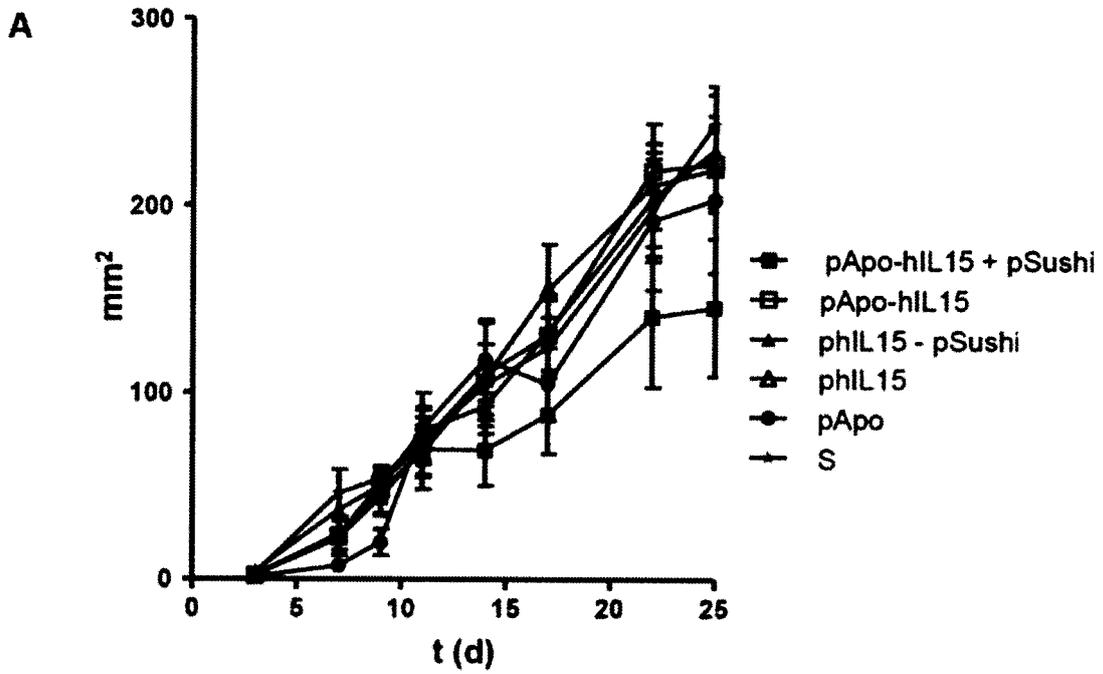


FIGURA 6

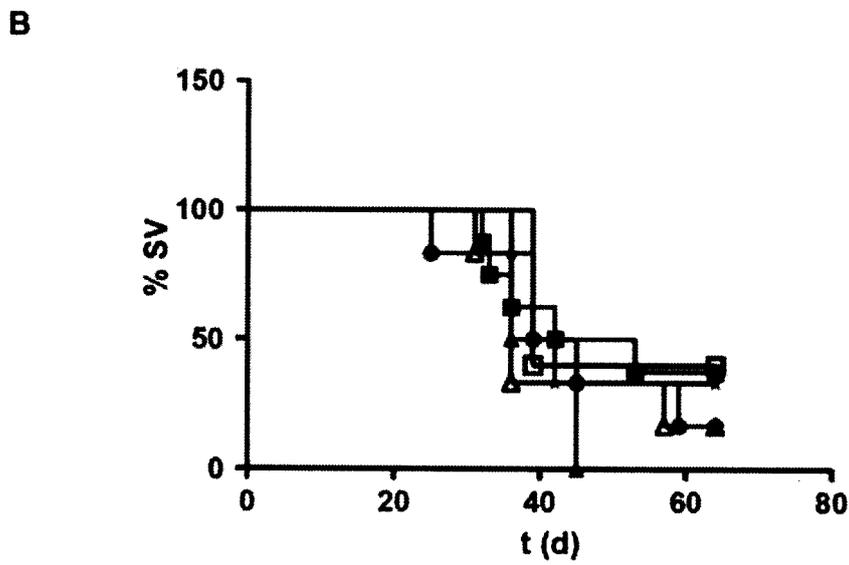
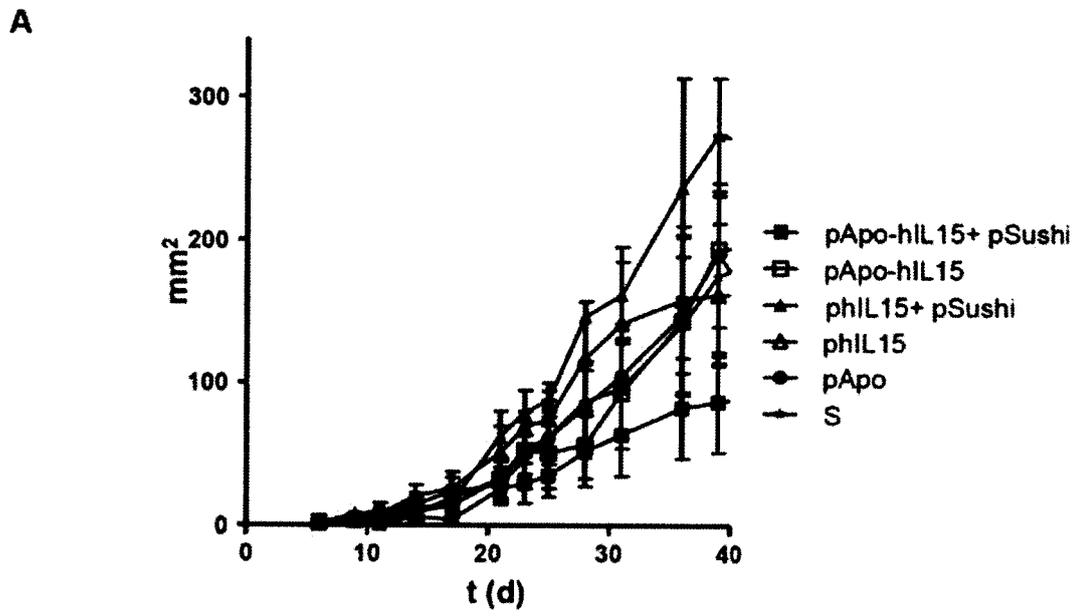


FIGURA 7

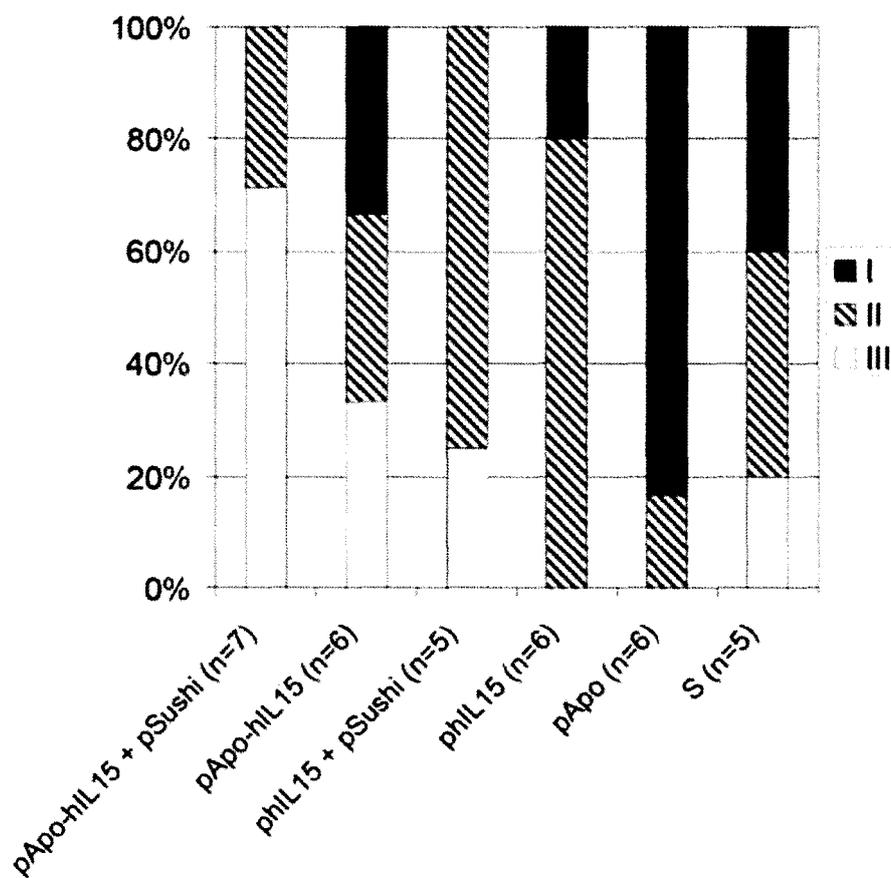


FIGURA 8

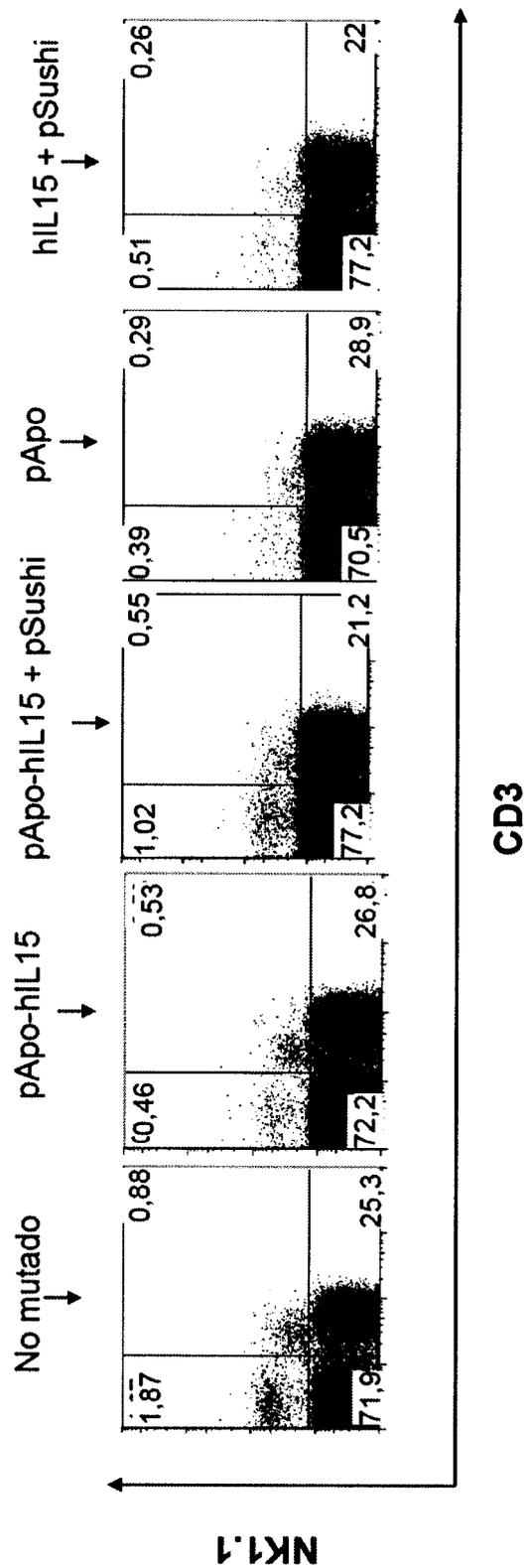


FIGURA 9A

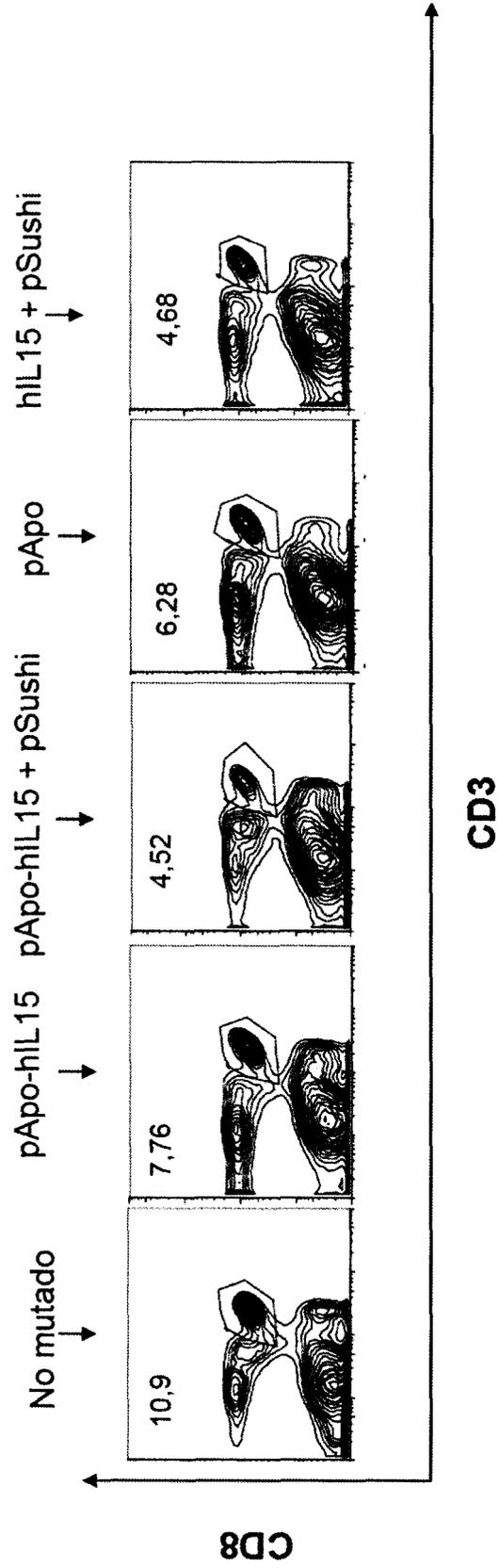


FIGURA 9B

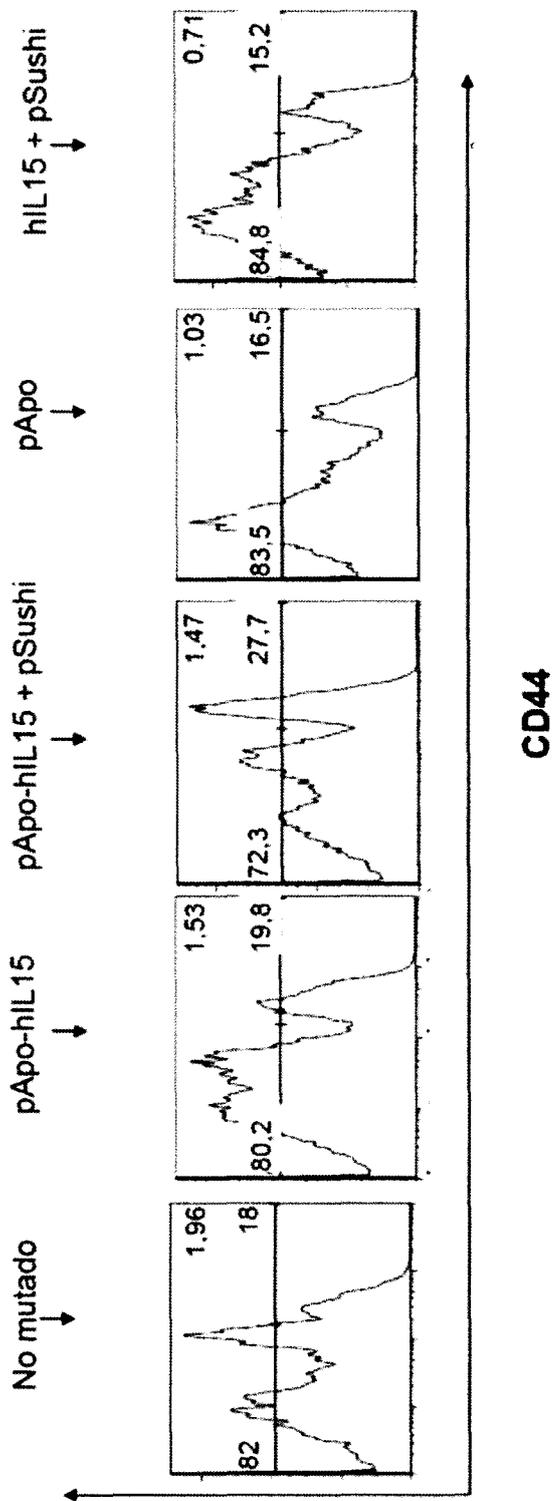


FIGURA 9C

ES 2 362 062 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

5 <120> NUEVOS CONJUGADOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA Y TRATAMIENTO ANTI-TUMORAL

<130> P5443ES00

10 <140> ES 200931158
<141> 2009-12-11

15 <160> 50

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
<211> 267
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

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

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
20 25 30

35 Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
35 40 45

40 Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
50 55 60

45 Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
65 70 75 80

50 Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
85 90 95

55 Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
100 105 110

60 Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
130 135 140

65 Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

ES 2 362 062 A1

	145	150	155	160
5	Leu Gln Glu Lys	Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala		
		165	170	175
10	Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp	180	185	190
15	Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn	195	200	205
20	Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu	210	215	220
25	Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln	225	230	235
30	Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala	245	250	255
35	Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln	260	265	
40	<210> 2 <211> 264 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>			
45	Met Lys Ala Val Val Leu Ala Val Ala Leu Val Phe Leu Thr Gly Ser	5	10	15
50	Gln Ala Trp His Val Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp	20	25	30
55	Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser	35	40	45
60	Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ser Leu Gly Gln Gln	50	55	60
65	Leu Asn Leu Asn Leu Leu Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val	65	70	75
70	Ser Gln Leu Gln Glu Arg Leu Gly Pro Leu Thr Arg Asp Phe Trp Asp	85	90	95

ES 2 362 062 A1

	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Glu	Met	Asn	Lys	Asp
				100					105					110		
5	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Gln
			115					120					125			
10	Lys	Lys	Trp	Lys	Glu	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Ala	Pro
		130					135					140				
15	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	Leu
	145					150					155					160
20	Gln	Gly	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Ala	Glu	Glu	Phe	Arg	Asp	Arg	Met	Arg
				165						170					175	
25	Thr	His	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu	Ala	Pro	His	Ser	Glu	Gln
				180					185					190		
30	Met	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Lys	Ser	Asn	Pro
			195					200					205			
35	Thr	Leu	Asn	Glu	Tyr	His	Thr	Arg	Ala	Lys	Thr	His	Leu	Lys	Thr	Leu
		210						215				220				
40	Gly	Glu	Lys	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	His	Ser	Leu	Met
	225					230					235					240
45	Pro	Met	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Thr	Lys	Ala	Gln	Ser	Val	Ile	Asp	Lys
					245					250					255	
50	Ala	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Ala	Gln								
				260												
55	<210> 3															
60	<211> 259															
65	<212> PRT															
70	<213> <i>Rattus norvegicus</i>															
75	<400> 3															
80	Met	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Thr	Gly	Cys
	1				5					10					15	
85	Gln	Ala	Trp	Glu	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Gln	Ser	Gln	Trp	Asp
				20					25					30		
90	<400> 3															

ES 2 362 062 A1

	Arg	Val	Lys	Asp	Phe	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Ala	Val	Lys	Asp	Ser
			35					40					45			
5	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Lys	Gln
		50					55					60				
10	Leu	Asn	Leu	Asn	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Thr	Leu	Gly	Ser	Thr	Val
	65					70				75					80	
15	Gly	Arg	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp	Ala
				85						90					95	
20	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Asp	Trp	Leu	Arg	Asn	Glu	Met	Asn	Lys	Asp
			100						105					110		
25	Leu	Glu	Asn	Val	Lys	Gln	Lys	Met	Gln	Pro	His	Leu	Asp	Glu	Phe	Gln
			115					120					125			
30	Glu	Lys	Trp	Asn	Glu	Glu	Val	Glu	Ala	Tyr	Arg	Gln	Lys	Leu	Glu	Pro
		130					135					140				
35	Leu	Gly	Thr	Glu	Leu	His	Lys	Asn	Ala	Lys	Glu	Met	Gln	Arg	His	Leu
	145					150					155				160	
40	Lys	Val	Val	Ala	Glu	Glu	Phe	Arg	Asp	Arg	Met	Arg	Val	Asn	Ala	Asp
				165					170						175	
45	Ala	Leu	Arg	Ala	Lys	Phe	Gly	Leu	Tyr	Ser	Asp	Gln	Met	Arg	Glu	Asn
				180					185					190		
50	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Thr	Glu	Ile	Lys	Asn	His	Pro	Thr	Leu	Ile	Glu
			195					200					205			
55	Tyr	His	Thr	Lys	Ala	Ser	Asp	His	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala
		210					215					220				
60	Lys	Pro	Ala	Leu	Asp	Asp	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Met	Pro	Val	Leu	Glu
	225				230						235				240	
65	Ala	Trp	Lys	Ala	Lys	Ile	Met	Ser	Met	Ile	Asp	Glu	Ala	Lys	Lys	Lys
				245						250					255	
70	Leu	Asn	Ala													

ES 2 362 062 A1

	cagccctacc tggacgaatt ccagaagaaa tggaaagagg atgtggagct ctaccgccag	420
	aaggtggcgc ctctgggcgc cgagctgcag gagagcgcgc gccagaagct gcaggagctg	480
5	caagggagac tgtcccctgt ggctgaggaa tttcgcgacc gcatgcgcac acacgtagac	540
	tctctgcgca cacagctagc gccccacagc gaacagatgc gcgagagcct ggcccagcgc	600
10	ctggctgagc tcaagagcaa ccctaccttg aacgagtacc acaccagggc caaaacccac	660
	ctgaagacac ttggcgagaa agccagacct gcgctggagg acctgcgcca tagtctgatg	720
15	cccattgctgg agacgcttaa gaccaaagcc cagagtgtga tcgacaaggc cagcgagact	780
	ctgactgccc agtga	795

20 <210> 6
 <211> 889
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

	agactgttgg agagctccgg gggaggtcgc cacatccttc aggatgaaag ctgcagtgtt	60
30	ggctgtggcc ctggtcttcc tgacaggttg ccaagcttgg gagttctggc agcaagatga	120
	gccccagtcc caatgggaca ggggtgaagga tttcgcact gtgtatgtgg atgcagtcaa	180
35	ggacagcggc agagactatg tgtcccagtt tgaatcctcc actttgggca aacagctgaa	240
	cctgaatctc ctggacaact gggacactct gggttcaact gttggtcgcc tacaggaaca	300
40	gctaggcca gtgactcagg agttctgggc taacctggag aaagaaacag attggctgag	360
	aaacgagatg aacaaggacc tggagaatgt gaaacagaag atgcagcccc acctggatga	420
	attccaggag aagtggaaacg aggaggtcga ggctaccgc cagaagctgg agcctctggg	480
45	caccgagctt cacaaaaacg cgaaggagat gcaaaggcat ctaaaggttg tggccgagga	540
	gtttcgagac cgcatgcgtg tgaatgcaga cgcgctgcgc gcaaagtttg ggctctacag	600
50	cgatcagatg cgcgagaacc tggcccagcg cctgaccgag atcaagaacc accctaccct	660
	gatcgagtat cataccaagg ccagcgacca cctgaagaca cttggtgaga aagccaaacc	720
	cgcgctggat gacctgggccc agggcctgat gccggtgctg gaagcctgga agccaaaat	780
55	catgagtatg atcgatgagg ccaaaaagaa gctgaacgct tagtgaggcg cccgtcacca	840
	ctccccaccc ctgaattggc tttcttacia taaacgtttc caaagtggg	889

60 <210> 7
 <211> 162
 <212> PRT
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 362 062 A1

<400> 7

```

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1           5           10           15
5
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
          20           25           30
10
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
          35           40           45
15
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
          50           55           60
20
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65           70           75           80
25
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
          85           90           95
30
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
          100          105          110
35
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
          115          120          125
40
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130          135          140
45
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145          150          155          160
45
Thr Ser

```

<210> 8

50 <211> 162

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

55 <400> 8

```

Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Ser Cys Tyr
1           5           10           15
60
Leu Cys Phe Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
          20           25           30
65

```


ES 2 362 062 A1

	65	70	75	80
5	Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln	85	90	95
10	Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg	100	105	110
15	Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val	115	120	125
20	Ile Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Arg Asn Phe	130	135	140
25	Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn	145	150	155
30	Thr Ser			160
35	<210> 10 <211> 162 <212> PRT <213> <i>Felis catus</i> <400> 10			
40	Met Arg Ile Leu Lys Pro Tyr Leu Arg Ser Thr Ser Ile Gln Cys Tyr	1	5	10
45	Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Cys Ile Pro	20	25	30
50	Val Phe Ile Leu Ser Cys Ile Asn Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala	35	40	45
55	Asn Trp Gln Asp Val Ile Ser Asp Leu Lys Ile Ile Asp Lys Ile Ile	50	55	60
60	Gln Ser Leu His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His	65	70	75
65	Pro Asn Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu His	85	90	95
70	Val Ile Ser Leu Glu Ser Lys Asn Glu Thr Ile His Gln Thr Val Glu	100	105	110

ES 2 362 062 A1

Asn Ile Ile Ile Leu Ala Asn Ser Gly Leu Ser Ser Asn Arg Asn Ile
115 120 125

5 Thr Glu Thr Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130 135 140

10 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160

15 Thr Ser

<210> 11
<211> 162
20 <212> PRT
<213> *Bos taurus*

<400> 11

25 Met Arg Ile Leu Lys Pro Tyr Leu Arg Ser Thr Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15

30 Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30

35 Val Phe Ile Leu Gly Cys Ile Ser Ala Ser Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45

40 Asn Trp Gln Tyr Val Ile Asn Asp Leu Lys Thr Ile Glu His Leu Ile
50 55 60

45 Gln Ser Ile His Met Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Ala His
65 70 75 80

50 Pro Asn Cys Lys Val Thr Ala Met Gln Cys Phe Leu Leu Glu Leu Arg
85 90 95

55 Val Ile Leu His Glu Ser Lys Asn Ala Thr Ile Tyr Glu Ile Ile Glu
100 105 110

Asn Leu Thr Met Leu Ala Asn Ser Asn Leu Ser Ser Ile Glu Asn Lys
115 120 125

60 Thr Glu Leu Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Ser Ile
130 135 140

65

ES 2 362 062 A1

Lys Glu Phe Leu Lys Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160

5 Thr Ser

<210> 12

10 <211> 411

<212> DNA

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia que codifica un polipéptido que comprende la IL15 humana

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1)..(66)

<223> Secuencia que codifica el péptido señal de la cadena IgV-ji

25 <220>

<221> mis_feature

<222> (67)..(411)

30 <223> Secuencia que codifica la IL15 humana madura (NM_172174.2 REGION: 990..1331)

<400> 12

35	atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtct	60
	agagccaact ggggtgaatgt aataagtgat ttgaaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct	120
	atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca	180
40	gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt	240
	attcatgata cagtagaaaa tctgatcadc ctagcaaaca acagtttgtc ttctaattggg	300
45	aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaaa tattaagaa	360
	tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg a	411

50 <210> 13

<211> 489

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

55 <400> 13

60	atgaaaattt tgaaaccata tatgaggaat acatccatct cgtgctactt gtgtttcctt	60
	ctaaacagtc actttttaac tgaggctggc attcatgtct tcattttggg ctgtgtcagt	120
	gtaggtctcc ctaaaacaga ggccaactgg atagatgtaa gatatgacct ggagaaaatt	180
65	gaaagcctta ttcaatctat tcatattgac accactttat aactgacag tgactttcat	240

ES 2 362 062 A1

cccagttgca aagttactgc aatgaactgc tttctcctgg aattgcaggt tattttacat 300
 gagtacagta acatgactct taatgaaaca gtaagaaacg tgctctacct tgcaaacagc 360
 5 actctgtctt ctaacaagaa tgtagcagaa tctggctgca aggaatgtga ggagctggag 420
 gagaaaacct tcacagagtt tttgcaaagc tttatacgca ttgtccaaat gttcatcaac 480
 10 acgtcctga 489

<210> 14

<211> 489

15 <212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 14

20 atgaaaattht tgaaaccata tatgaggaat acatccatct tgtactacct gtgtttcctt 60
 ctcaacagtc acttcttaac tgaggctggc atccatgtct tcattttggg ctgtgtcagt 120
 25 gtaggtctcc ctaaaacaga ggccaactgg atagatgtaa gatacgatct ggagaaaatt 180
 gaaagtctta ttcaattht tcatattgat actactctat aactgacag tgactthcat 240
 30 cccagttgca aagttactgc aatgaactgc tttctcctgg aattacaggt tattttgcac 300
 gagtacagta acatgactct taatgaaaca gtaagaaacg tgctctacct tgcaaacagc 360
 actctgtctt ctaacaagaa tgtaatagag tctggctgca aggaatgtga ggagctggag 420
 35 gagagaaact tcacggagtt tttgcagagt tttatacata ttgtccaaat gttcatcaac 480
 acgtcctga 489

40 <210> 15

<211> 489

<212> DNA

45 <213> *Felis catus*

<400> 15

50 atgagaattht tgaaaccata tttgagaagt acttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
 ctgaacagcc atthtttaac tgaagcttgc attcctgttt tcattttgag ctgtattaat 120
 gcaggctctc ctaaaacaga ggccaactgg caggatgtaa taagtgattt gaaaataatt 180
 55 gacaagatta ttcaatcctt acatatcgat gccacttht atactgaaag tgatgttcat 240
 cccaattgca aagtaacagc gatgaagtgc tttctcctgg agttacatgt tatttcgctt 300
 60 gagtccaaaa atgagacat tcatcaaaca gtagaaaaca ttattatcct ggcaaacagt 360
 ggthtatctt ctaacaggaa tataactgaa acaggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
 65 gaaaagaaca ttaaagaatt tctgcagagt tttgtacata ttgtacaaat gttcatcaac 480
 acttcttga 489

ES 2 362 062 A1

<210> 16
 <211> 489
 <212> DNA
 5 <213> *Bos taurus*

 <400> 16

 10 atgagaattt tgaaccata ttgagaagt acttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
 ctgaacagtc attttttaac agaggctggc attcatgtct tcattttggg ctgtatcagt 120
 15 gcaagtcttc ccaaaacaga agcaaactgg cagtatgtaa taaatgattt gaaaacaatt 180
 gagcatctta ttcaatctat acatatggat gccactttat atactgaaag tgatgctcat 240
 cccaattgca aagtaacagc gatgcagtgc tttctcctgg agttacgagt tattttacac 300
 20 gagtccaaaa atgccaccat ttatgaaata atagaaaatc ttaccatgct agcaaacagc 360
 aatttatctt ctattgagaa taaaacagaa ttgggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
 25 gaaaaaagta tcaaagaatt tttgaagagt tttgtacata ttgtgcaaat gttcatcaac 480
 acttcttga 489

30 <210> 17
 <211> 61
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*

 <400> 17

 40 Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
 1 5 10 15

 45 Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

 50 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

 55 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

55 <210> 18
 <211> 61
 <212> PRT
 60 <213> *Mus musculus*

65

ES 2 362 062 A1

<400> 18

```

5      Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg Val Lys Asn
      1          5          10          15

      Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser Gly Phe Lys
      20          25          30

      Arg Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile Asn Lys Asn
      35          40          45

15     Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
      50          55          60

```

20 <210> 19

<211> 291

<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi de la subunidad alfa del receptor de IL15 humano (IL15RA)

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (1)..(288)

<223> Secuencia que codifica el péptido señal y el dominio Sushi de la subunidad alfa del receptor de IL15 humano (IL15RA) (NM_002189.2 REGION: 83..371)

40 <400> 19

```

      atggccccgc ggccggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg      60
45     ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa      120
      cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac      180
      tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtggt gaacaaggcc      240
50     acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagactg a      291

```

55 <210> 20

<211> 273

<212> DNA

<213> Artificial

60 <220>

<223> Secuencia que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi del Receptor IL15alfa murino (Il15ra)

65 <220>

<221> misc_features

<222> (1)..(64)

ES 2 362 062 A1

<223> Secuencia que codifica un péptido señal de Ig-kappa

<220>

5 <221> misc_features
<222> (65)..(273)
<223> Secuencia que codifica el dominio Sushi de la subunidad alpha del receptor de la IL15 (Il15ra) murino

10 <400> 20

atggagacag acaccctgct gctctgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg ctctaccggc 60

15 gacggcacca cctgccctcc ccctgtgtcc atcgagcacg ccgacatcag agtgaagaac 120

tactccgtga actctcggga gagatacgtg tgcaactccg gcttcaagcg gaaggccggc 180

20 acctccaccc tgatcgagtg cgtgatcaac aagaacacca acgtggccca ctggaccacc 240

ccttcctga agtgcacccg ggacccttcc tga 273

25 <210> 21
<211> 279
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 21

atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60

35 ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120

cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180

40 tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtggt gaacaaggcc 240

acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgc 279

45 <210> 22
<211> 93
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 362 062 A1

<400> 22

```

5      Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
      1          5          10          15

      Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
      20          25          30

      Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
      35          40          45

15     Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
      50          55          60

20     Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
      65          70          75          80

25     Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
      85          90

```

<210> 23

30 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Enlazador

<400> 23

```

40     Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr
      1          5          10

```

45 <210> 24

<211> 15

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

55 <400> 24

```

60     Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr
      1          5          10          15

```

<210> 25

65 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 362 062 A1

<220>
<223> Enlazador

5 <400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro
1 5

10

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
20 <223> Enlazador

<400> 26

25 Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 27
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Enlazador

<400> 27
40

Gly Thr Lys Val His Met Lys
1 5

45 <210> 28
<211> 13
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

55 <400> 28

60 Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln
1 5 10

<210> 29
65 <211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 362 062 A1

<220>

<223> Enlazador

5 <400> 29

Gly Thr Ser Gly Gln
1 5

10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

20

<400> 30

25

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

<210> 31

30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Enlazador

<400> 31

40

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr
1 5 10

45

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

50

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

55

<400> 32

60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

65

Ser Leu Gln

ES 2 362 062 A1

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Sitio de cote de enteroquinasa
10
<400> 33

Asp Asp Asp Asp Lys
15 1 5

<210> 34
<211> 5
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> Sitio de corte de Factor Xa

<400> 34

30 Ile Glu Asp Gly Arg
1 5

<210> 35
35 <211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Sitio de corte de trombina

45 <400> 35

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

50 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de proteasa TEV
60
<400> 36

65 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

ES 2 362 062 A1

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de proteasa PreScission
10
<400> 37

15 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 1 5

<210> 38
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Sitio de corte de MMP9

<400> 38
30
 Leu Phe Pro Thr Ser
 1 5

35 <210> 39
<211> 1155
<212> DNA
40 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia que codifica la proteína de fusión hApo-hIL15

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(801)

50 <223> Secuencia que codifica la apolipoproteína A-I humana (APOA1) (NM_000039.1 REGION: 39..839)

<220>
<221> misc_feature

55 <222> (802)..(810)
<223> Secuencia que codifica el enlazador GAP

<220>

60 <221> misc_feature
<222> (811)..(1153)
<223> Secuencia que codifica la IL15 humana madura (NM_172174.2 REGION: 990..1331)

65

ES 2 362 062 A1

<400> 39

	atgaaagctg cgggtgctgac cttggccgtg ctcttcctga cggggagcca ggctcggcat	60
5	ttctggcagc aagatgaacc cccccagagc ccctgggatc gagtgaagga cctggccact	120
	gtgtacgtgg atgtgctcaa agacagcggc agagactatg tgtcccagtt tgaaggctcc	180
10	gccttgggaa aacagctaaa cctaaagctc cttgacaact gggacagcgt gacctccacc	240
	ttcagcaagc tgcgcgaaca gctcggccct gtgaccagc agttctggga taacctggaa	300
15	aaggagacag agggcctgag gcaggagatg agcaaggatc tggaggaggt gaaggccaag	360
	gtgcagccct acctggacga cttccagaag aagtggcagg aggagatgga gctctaccgc	420
	cagaaggtgg agccgctgcg cgcagagctc caagagggcg cgcgccagaa gctgcacgag	480
20	ctgcaagaga agctgagccc actgggagc gagatgagcg accgcgagcg cgcccatgtg	540
	gacgcgctgc gcacgcatct ggccccctac agcagcagc tgcgccagcg cttggccgag	600
25	cgccttgagg ctctcaagga gaacggcggc gccagactgg ccgagtacca cgccaaggcc	660
	accgagcatc tgagcacgct cagcgagaag gccaagcccg cgctcgagga cctccgcaa	720
	ggcctgctgc ccgtgctgga gagcttcaag gtcagcttcc tgagcgtct cgaggagtac	780
30	actaagaagc tcaacaccca gggcgcgccc aactgggtga atgtaataag tgatttga	840
	aaaattgaag atcttattca atctatgcat attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat	900
35	gttcaccca gttgcaaagt aacagcaatg aagtgcttcc tcttggagtt acaagttatt	960
	tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat gatacagtag aaaatctgat catcctagca	1020
40	aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa	1080
	ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg cagagttttg tacatattgt ccaaagtgtc	1140
45	atcaacactt cttga	1155

<210> 40

<211> 1146

50 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

55 <223> Secuencia que codifica una proteína de fusión mApo-hIL15

<220>

<221> misc_feature

60 <222> (1)..(792)

<223> Secuencia que codifica la apolipoproteína A-I murina (Apoa1) (NM_009692.2 REGION: 47..838)

<220>

65 <221> misc_feature

<222> (793)..(800)

<223> Secuencia que codifica el enlazador GAP

ES 2 362 062 A1

<220>

<221> misc_feature

<222> (801)..(1143)

5 <223> Secuencia que codifica la IL15 humana madura (NM_172174.2 REGION: 990..1331)

<400> 40

```
10  atgaaagctg tgggtgctggc cgtggctctg gtcttcctga cagggagcca ggcttggcac      60
    gtatggcagc aagatgaacc ccagtcctcaa tgggacaaag tgaaggattt cgctaattgt      120
15  tatgtggatg cgggtcaaaga cagcggcaga gactatgtgt cccagtttga atcctcctcc      180
    ttgggccaac agctgaacct gaatctcctg gaaaactggg aactctctggg ttcaaccgtt      240
    agtcagctgc aggaacggct gggcccattg actcgggact tctgggataa cctggagaaa      300
20  gaaacagatt ggggtgagaca ggagatgaac aaggacctag aggaagtgaa acagaaggtg      360
    cagccctacc tggacgaatt ccagaagaaa tggaaagagg atgtggagct ctaccgccag      420
25  aaggtggcgc ctctggggcg cgagctgcag gagagcgcgc gccagaagct gcaggagctg      480
    caagggagac tgtcccctgt ggctgaggaa tttcgcgacc gcatgcgcac acacgtagac      540
30  tctctgcgca cacagctagc gccccacagc gaacagatgc gcgagagcct ggcccagcgc      600
    ctggctgagc tcaagagcaa ccctaccttg aacgagtacc acaccagggc caaaaccac      660
    ctgaagacac ttggcgagaa agccagacct gcgctggagg acctgcgcca tagtctgatg      720
35  cccatgctgg agaogcttaa gaccaaagcc cagagtgtga tcgacaaggc cagcgagact      780
    ctgactgcc  agggcgcgcc caactgggtg aatgtaataa gtgatttgaa aaaaattgaa      840
40  gatcttattc aatctatgca tattgatgct actttatata cggaaagtga tgttcacccc      900
    agttgcaaag taacagcaat gaagtgcttt ctcttggagt tacaagttat ttcacttgag      960
45  tccggagatg caagtattca tgatacagta gaaaatctga tcatcctagc aaacaacagt     1020
    ttgtcttcta atgggaatgt aacagaatct ggatgcaaag aatgtgagga actggaggaa     1080
    aaaaatatta aagaatTTTT gcagagtttt gtacatattg tccaaatggt catcaacact     1140
50  tcttga                                             1146
```

<210> 41

55 <211> 1290

<212> DNA

<213> mApoA1-mIL15

60

65

ES 2 362 062 A1

<400> 41

	atgaaagctg tgggtgctggc cgtggctctg gtcttcctga cagggagcca ggcttggcac	60
5	gtatggcagc aagatgaacc ccagtcctca tgggacaaag tgaaggattt cgctaattgtg	120
	tatgtggatg cgggtcaaaga cagcggcaga gactatgtgt cccagtttga atcctcctcc	180
10	ttgggccaac agctgaaact gaatctcctg gaaaactggg aactctggg ttcaaccggt	240
	agtcagctgc aggaacggct gggcccattg actcgggact tctgggataa cctggagaaa	300
15	gaaacagatt ggggtgagaca ggagatgaac aaggacctag aggaagtgaa acagaagggtg	360
	cagccctacc tggacgaatt ccagaagaaa tggaaagagg atgtggagct ctaccgccag	420
	aaggtggcgc ctctggggcgc cgagctgcag gagagcgcgc gccagaagct gcaggagctg	480
20	caagggagac tgtcccctgt ggctgaggaa tttcgcgacc gcatgcgcac acacgtagac	540
	tctctgcgca cacagctagc gccccacagc gaacagatgc gcgagagcct ggcccagcgc	600
25	ctggctgagc tcaagagcaa ccctaccttg aacgagtacc acaccagggc caaaaccac	660
	ctgaagacac ttggcgagaa agccagacct gcgctggagg acctgcgcca tagtctgatg	720
	cccatgctgg agacgcttaa gaccaaagcc cagagtgtga tcgacaaggc cagcgagact	780
30	ctgactgcc caggcgcgccc catgaaaatt ttgaaacat atatgaggaa tacatccatc	840
	tcgtgctact tgtgtttcct tctaaacagt cactttttaa ctgaggctgg cattcatgtc	900
35	ttcattttgg gctgtgtcag tgtaggtctc ctaaaacag aggccaactg gatagatgta	960
	agatatgacc tggagaaaaat tgaaagcctt attcaatcta ttcataattga caccacttta	1020
40	tacactgaca gtgactttca tcccagttgc aaagtactg caatgaactg ctttctcctg	1080
	gaattgcagg ttattttaca tgagtacagt aacatgactc ttaatgaaac agtaagaaac	1140
	gtgctctacc ttgcaaacag cactctgtct tctaacaaga atgtagcaga atctggctgc	1200
45	aaggaatgtg aggagctgga ggagaaaacc ttcacagagt ttttgcaaag ctttatacgc	1260
	attgtccaaa tgttcatcaa cacgtcctga	1290

50

<210> 42

<211> 443

55 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

60 <223> hSushi-hIL15-hApoA1

65

ES 2 362 062 A1

<400> 42

5	Cys 1	Pro	Pro	Pro	Met 5	Ser	Val	Glu	His	Ala 10	Asp	Ile	Trp	Val	Lys 15	Ser
10	Tyr	Ser	Leu	Tyr 20	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr 25	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly 30	Phe	Lys
15	Arg	Lys	Ala 35	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala
20	Thr	Asn 50	Val	Ala	His	Trp	Thr 55	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys 60	Cys	Ile	Arg	Asp
25	Gly 65	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly 75	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 80
30	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp 85	Val	Asn	Val	Ile	Ser 90	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu 95
35	Asp	Leu	Ile	Gln 100	Ser	Met	His	Ile	Asp 105	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser
40	Asp	Val	His 115	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr 120	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu
45	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala 140	Ser	Ile	His	Asp
50	Thr 145	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn 155	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn 160
55	Gly	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu 175
60	Lys	Asn	Ile	Lys 180	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met 190
65	Phe	Ile	Asn 195	Thr	Ser	Gly	Ala	Pro	Asp 200	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp 205
70	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp

ES 2 362 062 A1

<210> 43

<211> 459

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> mSushi-mIL15-mApoA1

10

<400> 43

15	Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Ser	Ile	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Arg	Val	Lys	Asn
	1				5					10					15	
20	Tyr	Ser	Val	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Val	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys
				20					25					30		
25	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Ile	Glu	Cys	Val	Ile	Asn	Lys	Asn
			35					40					45			
30	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Gly	Ser
		50					55					60				
35	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln
	65					70					75					80
40	Thr	Glu	Ala	Gly	Ile	His	Val	Phe	Ile	Leu	Gly	Cys	Val	Ser	Val	Gly
					85					90					95	
45	Leu	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala	Asn	Trp	Ile	Asp	Val	Arg	Tyr	Asp	Leu	Glu
				100					105					110		
50	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Ile	Gln	Ser	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr
			115					120					125			
55	Thr	Asp	Ser	Asp	Phe	His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Asn	Cys
		130					135					140				
60	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Leu	His	Glu	Tyr	Ser	Asn	Met	Thr
	145					150					155					160
65	Leu	Asn	Glu	Thr	Val	Arg	Asn	Val	Leu	Tyr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr	Leu
					165					170					175	
70	Ser	Ser	Asn	Lys	Asn	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu
				180					185					190		
75	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Thr	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Ile	Arg	Ile
			195					200					205			

ES 2 362 062 A1

	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn	Thr	Ser	Gly	Ala	Pro	Asp	Glu	Pro	Gln	Ser	
	210						215					220					
5		Gln	Trp	Asp	Lys	Val	Lys	Asp	Phe	Ala	Asn	Val	Tyr	Val	Asp	Ala	Val
	225					230					235						240
10	Lys	Asp	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu
					245					250						255	
15	Gly	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Trp	Asp	Thr	Leu	Gly	
				260					265					270			
20	Ser	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Gln	Glu	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Thr	Arg	Asp	
			275					280					285				
25	Phe	Trp	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Glu	Met	
		290					295					300					
30	Asn	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	
	305					310					315					320	
35	Glu	Phe	Gln	Lys	Lys	Trp	Lys	Glu	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	
				325						330					335		
40	Val	Ala	Pro	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	
				340					345					350			
45	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Ala	Glu	Glu	Phe	Arg	Asp	
			355					360					365				
50	Arg	Met	Arg	Thr	His	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu	Ala	Pro	His	
	370						375					380					
55	Ser	Glu	Gln	Met	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	Lys	
	385					390					395					400	
60	Ser	Asn	Pro	Thr	Leu	Asn	Glu	Tyr	His	Thr	Arg	Ala	Lys	Thr	His	Leu	
					405					410					415		
65	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	His	
				420					425					430			
70	Ser	Leu	Met	Pro	Met	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Thr	Lys	Ala	Gln	Ser	Val	
			435					440					445				
75	Ile	Asp	Lys	Ala	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Ala	Gln						
	450						455										

ES 2 362 062 A1

<210> 44
 <211> 1428
 <212> DNA
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia que codifica una proteína de fusión hSushi-hIL15-hApo
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(288)
 15 <223> Secuencia que codifica el péptido señal y el dominio Sushi de la subunidad alfa del receptor de IL15 humano (IL15RA) (NM_002189.2 REGION: 83..371)

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (289)..(345)
 <223> Secuencia que codifica un enlazador (Linker)

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (346)..(687)
 30 <223> Secuencia que codifica la IL15 humana madura (NM_172174.2 REGION: 990..1331)

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (688)..(696)
 <223> Secuencia que codifica el enlazador GAP (Linker)

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (697)..(1425)
 <223> Secuencia que codifica la apolipoproteína A-I humana madura (APOA1) (NM_000039.1 REGION: 111..839)

 45 <400> 44

 atggccccgc ggcgggocgc cggctgccgg accctcggtc tcccggecgt gctactgctg 60
 50 ctgctgctcc ggccgcgcgc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120
 cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta ctttgtaac 180
 55 tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcggtgtt gaacaaggcc 240
 acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagacgg cggctctgga 300
 ggtggaggat ccggcggagg atctggcggc ggaggaagcc tgcagaactg ggtgaatgta 360
 60 ataagtgatt tgaaaaaaaa tgaagatctt attcaatcta tgcataattga tgctacttta 420
 tatacggaaa gtgatgttca ccccagttgc aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg 480

 65

ES 2 362 062 A1

	gagttacaag ttatttcaact tgagtcgga gatgcaagta ttcattgatac agtagaaaat	540
	ctgatcatcc tagcaaacaa cagtttgtct tctaattggga atgtaacaga atctggatgc	600
5	aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaat attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat	660
	attgtccaaa tgttcatcaa cacttctggc gcgcccgatg aacccccca gagcccctgg	720
10	gatcgagtga aggacctggc cactgtgtac gtggatgtgc tcaaagacag cggcagagac	780
	tatgtgtccc agtttgaagg ctccgccttg ggaaaacagc taaacctaaa gctccttgac	840
15	aactgggaca gcgtgacctc caccttcagc aagctgctgc aacagctcgg ccctgtgacc	900
	caggagtctt gggataacct ggaaaaggag acagagggcc tgaggcagga gatgagcaag	960
	gatctggagg aggtgaaggc caaggtgcag ccctacctgg acgacttcca gaagaagtgg	1020
20	caggaggaga tggagctcta ccgccagaag gtggagccgc tgcgcgcaga gctccaagag	1080
	ggcgcgcgcc agaagctgca cgagctgcaa gagaagctga gccactggg cgaggagatg	1140
25	cgcgaccgcg cgcgccccca tgtggacgcg ctgctgcacgc atctggcccc ctacagcgac	1200
	gagctgcgcc agcgttggc cgcgcgctt gaggctctca aggagaacgg cggcgccaga	1260
30	ctggccgagt accacgcaa ggccaccgag catctgagca cgctcagcga gaaggccaag	1320
	cccgcgctcg aggaactccg ccaaggcctg ctgccctgctc tggagagctt caaggtcagc	1380
	ttctgagcg ctctcgagga gtacactaag aagctcaaca cccagtga	1428
35	<210> 45	
	<211> 1407	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> mSushi-mIL15-mApo	
45	<400> 45	
	atggagacag acacctgct gctctgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg ctctaccggc	60
50	gacggcacca cctgccctcc ccctgtgtcc atcgagcacg ccgacatcag agtgaagaac	120
	tactccgtga actctcggga gagatacgtg tgcaactccg gcttcaagcg gaaggccggc	180
55	acctccacc tgatcgagtg cgtgatcaac aagaacacca acgtggccca ctggaccacc	240
	ccttccctga agtgcacccg ggacccttcc ggcggctctg gaggtggagg atccggcgga	300
60	ggatctggcg gcggaggaag cctgcaggag gccaaactgga tcgacgtgct ctacgacctg	360
	gagaagatcg agtccctgat ccagtcacac cacatcgaca ccacctgta caccgactcc	420
	gacttccacc cttcctgcaa ggtgaccgcc atgaactgct ttctgctgga gctgcagggtg	480
65	atcctgcacg agtactccaa catgaccctg aacgagacag tgcggaacgt gctgtacctg	540

ES 2 362 062 A1

	gccaactcca ccctgtcctc caacaagaac gtggccgagt ccggctgcaa ggagtgcgag	600
	gagctggagg agaagacctt caccgagttt ctgcagtctt tcatccggat cgtgcagatg	660
5	ttcatcaaca ccagcggcgc gcccgatgaa ccccagtccc aatgggacaa agtgaaggat	720
	ttcgctaata tgtatgtgga tgcgggtcaaa gacagcggca gagactatgt gtcccagttt	780
10	gaatcctcct ccttgggcca acagctgaac ctgaatctcc tggaaaactg ggacactctg	840
	ggttcaaccg ttagtcagct gcaggaacgg ctgggcccct tgactcggga cttctgggat	900
15	aacctggaga aagaaacaga ttgggtgaga caggagatga acaaggacct agaggaagtg	960
	aaacagaagg tgcagcccta cctggacgaa ttccagaaga aatggaaaga ggatgtggag	1020
	ctctaccgcc agaaggtggc gcctctgggc gccgagctgc aggagagcgc gcgccagaag	1080
20	ctgcaggagc tgcaaggag actgtcccct gtggctgagg aatttcgca cgcgatcgc	1140
	acacacgtag actctctgcg cacacagcta gcgccccaca gcgaacagat gcgagagc	1200
25	ctggcccagc gcctggctga gctcaagagc aaccctacct tgaacgagta ccacaccagg	1260
	gccaaaacc acctgaagac acttggcgag aaagccagac ctgcgctgga ggacctg	1320
	catagtctga tgcccagct ggagacgctt aagaccaaag cccagagtgt gatcgacaag	1380
30	gccagcgaga ctctgactgc ccagtga	1407

<210> 46

35 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador FwATGmApoA1

45 <400> 46

atgaaagctg tgggtgctggc

20

50 <210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

55

<220>

<223> Cebador RvTGAmApoA1

60 <400> 47

tcactgggca gtcagagtct

20

65

<210> 48

<211> 28

ES 2 362 062 A1

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador FwAscIhIL15

<400> 48

10 aataatggcg cgccgaactg gatagatg 28

15 <210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador RvNotIhIL15

25 <400> 49

gttcatcaac acgtcctgag cggccgc 27

30 <210> 50
<211> 28
<212> DNA

35 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador RvAscImApoA1

40 <400> 50

ggcgcgccct gggcagtcag agtctcgc 28

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200931158

②² Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MORTIER et al. "Soluble Interleukin-15 Receptor α (IL-15R α)-sushi as a Selective and Potent Agonist of IL-15 Action through IL-15R β/γ . Hyperagonist IL-15.IL-15R α fusion proteins". The Journal of Biological Chemistry. 2006. Vol. 281 (3), páginas 1612-1619, todo el documento.	1-16
Y	US 2008138394 A1 (MEEHYEIN et al. [KR]) 12.06.2008, resumen; página 1, párrafos 0006-0011; página 3, párrafos 0043-0047; reivindicaciones 1,6,9,10,13,14,17.	1-16
A	WO 2005070400 A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE [US]) 04.08.2005, página 5, líneas 15-18; página 6, líneas 25-28; reivindicaciones 1,19,20,21.	1-5,7,11,14-16
A	WO 2008007146 A1 (UPPERTON LIMITED [GB]) 17.01.2008, resumen; página 29, línea 13 – página 30, línea 5; reivindicaciones 1,3,5.	1-5,7,11,14-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
22.03.2011

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/48 (2006.01)

C07K14/54 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MORTIER et al. The Journal of Biological Chemistry. 2006. Vol. 281 (3), páginas 1612-1619.	2006
D02	US 2008138394 A1	12.06.2008
D03	WO 2005070400 A1	04.08.2005
D04	WO 2008007146 A1	17.01.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga composiciones y proteínas de fusión con capacidad inmunomoduladora que comprenden la apolipoproteína A (Apo A), la interleuquina 15 (IL15), y el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 (IL15R α -Sushi), o variantes funcionales de estos polipéptidos. Se refiere también a polinucleótidos que codifican los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención y a vectores y células hospedadoras para la expresión de dichos polipéptidos o proteínas de fusión. Adicionalmente, la solicitud divulga métodos in vitro para estimular la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno y el uso de medicamentos que comprenden los productos de la invención para el tratamiento de infecciones, alergias o neoplasias.

El documento D01 se refiere a la capacidad de estimulación de la expansión de linfocitos T y células "natural killer" (NK) de composiciones que comprenden IL15 y el dominio Sushi del receptor de IL15, así como de proteínas de fusión constituidas por la unión covalente de IL15 e IL15R α -Sushi a través de un enlazador peptídico. Asimismo, los autores hacen referencia al potencial uso terapéutico de las proteínas de fusión de IL15 y IL15R α -Sushi como adyuvantes en terapias contra el cáncer, inmunodeficiencias y enfermedades infecciosas (ver todo el documento).

El documento D02 divulga composiciones farmacéuticas que comprenden agentes anticancerígenos o antivirales como polinucleótidos o polipéptidos, entre los que se incluye IL15. Estos agentes se incorporan en liposomas que son específicamente dirigidos al hígado gracias al uso de Apo A (resumen; página 1, párrafos 0006-0011; página 3, párrafos 0043-0047; reivindicaciones 1, 6, 9, 10, 13, 14, 17).

El documento D03 se refiere a agentes de contraste, empleados en técnicas de diagnóstico por imagen, que se conjugan con componentes proteicos en nanopartículas. En particular, comprende el uso en dichas nanopartículas de Apo A1 como transportador específico de agentes de contraste a placas arterioescleróticas (ver página 5, líneas 15-18; página 6, líneas 25-28; reivindicaciones 1, 19, 20, 21).

El documento D04 tiene por objeto la producción de partículas constituidas por proteínas unidas covalentemente. Dichas partículas pueden ser utilizadas para el transporte y liberación de agentes terapéuticos en el cuerpo humano. Como ejemplo, los inventores de D04 preparan las mencionadas partículas empleando Apo A (ver resumen, página 29, línea 13 – página 30, línea 5; reivindicaciones 1, 3, 5).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).**1.1. Reivindicaciones 1-16.**

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica al objeto de la presente solicitud, ya que anticipa composiciones que comprenden IL15 e IL15R α -Sushi y proteínas de fusión en las que estos dos polipéptidos se encuentran unidos covalentemente a través de enlazadores peptídicos. D01 establece además la capacidad estimuladora de la proliferación de linfocitos T de las mencionadas composiciones y proteínas de fusión y su potencial aplicación terapéutica en enfermedades infecciosas y tumorales. Asimismo, la metodología empleada en D01 abarca polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de IL15 e IL15R α -Sushi, así como los vectores y células para llevar a cabo su expresión.

Sin embargo, existe una clara diferencia entre D01 y la presente solicitud, que consiste en la incorporación del polipéptido Apo A a las composiciones y proteínas de fusión de la invención. Este elemento se encuentra ausente en el conjunto de polipéptidos y proteínas de fusión divulgadas en D01.

Por su parte, D02 recoge el uso de Apo A unido covalentemente a liposomas que pueden ser empleados para el transporte específico de agentes terapéuticos al hígado. Sin embargo, dichas construcciones difieren en su naturaleza química de las proteínas de fusión de la presente solicitud.

En base a lo expuesto, ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados en cuenta anticipa de forma idéntica el objeto de la presente solicitud y, en consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-16 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-16.

La invención objeto de la presente solicitud aborda el problema de la mejora de la actividad inmunoestimuladora de IL15. A este respecto, el estado de la técnica, y en particular el documento D01, nos indica que es posible obtener una mayor actividad estimuladora de la expansión de los linfocitos T cuando se administran conjuntamente IL15 e IL15R α -Sushi, y que esta mejora es aún más notable cuando se emplean ciertas proteínas de fusión que comprenden IL15 e IL15R α -Sushi unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico.

La solución aportada por los inventores, que a su vez constituye la diferencia fundamental con D01, es la incorporación de Apo A a las composiciones y proteínas de fusión que contienen IL15 e IL15R α -Sushi. Esta incorporación produce, a la luz de la descripción aportada por los inventores, una actividad superior de IL15 en la estimulación de la expansión de linfocitos T, que finalmente se traduce en un mayor efecto terapéutico, en particular en un mayor efecto antitumoral de las composiciones y proteínas de fusión de la invención.

Sin embargo, cabe señalar que la conjugación de Apo A a compuestos de interés terapéutico se encuentra en el estado de la técnica. Más aún, la mejora del perfil farmacológico de ciertos agentes terapéuticos mediante la conjugación de los mismos con Apo A es un hecho anticipado en el estado de la técnica, y en concreto en D02. Por lo tanto, se considera que ante el problema técnico planteado resultaría obvio para un experto en la materia aplicar las enseñanzas de los documentos D01 y D02 de forma conjunta y emplear Apo A en las composiciones y proteínas de fusión de D01 para mejorar la actividad inmunomoduladora de IL15.

Por último, en referencia a los métodos definidos en las reivindicaciones 12 y 13, se considera que éstos constituyen procedimientos básicos conocidos en inmunología para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno. Por lo tanto, su aplicación resultaría obvia para un experto en la materia toda vez que los productos empleados en dichos métodos no implican un salto inventivo según se ha argumentado en el párrafo anterior.

En consecuencia, el objeto de la presente solicitud tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 16 no satisfaría el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).