



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 027**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05707720 .8**

96 Fecha de presentación : **10.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1718670**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54

Título: **Sitio de unión de la IL-15 para IL-15Ralfa y mutantes específicos de IL-15 que tienen actividad agonista/antagonista.**

30

Prioridad: **27.02.2004 EP 04290542**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73

Titular/es: **INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale)**
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR

72

Inventor/es: **Bernard, Jérôme;**
Plet, Ariane;
Jacques, Yannick;
Harb, Catherine;
Quemener, Agnès y
Mortier, Erwan

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 367 027 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sitio de unión de la IL-15 para IL-15Ralfa y mutantes específicos de IL-15 que tienen actividad agonista/antagonista

5 **CAMPO DE LA INVENCION:**

[0001] La presente memoria descriptiva describe la identificación de un sitio de unión de la IL-15 humana para el IL-15Ralfa. También se proporcionan agonistas y antagonistas de la IL-15 que se dirigen a la cadena IL-15Ralfa, es decir, la cadena que confiere al complejo receptor IL-15R su especificidad por la IL-15.

10

[0002] En la presente solicitud, se hace referencia a diferentes publicaciones científicas. Estas publicaciones están listadas al final de la parte de ejemplos, antes de las reivindicaciones. En el texto de la solicitud se hace referencia a las mismas mediante un número entre paréntesis; este número corresponde al número en la lista de publicaciones.

15

ANTECEDENTES TÉCNICOS:

[0003] La interleuquina-15 (IL-15) se identificó como una nueva citoquina que podía sustituir la IL-2 en el mantenimiento de la proliferación de una línea de linfocitos T murina (1, 2). Ambas citoquinas pertenecen a la familia de haces de 4 hélices alfa (3). Inicialmente se encontró que la IL-15 imitaba la mayoría de las actividades in vitro producidas por la IL-2 in vitro, incluyendo la inducción de proliferación y citotoxicidad por linfocitos T activados (1) y linfocitos citolíticos naturales (2, 4), la coestimulación de la proliferación de linfocitos B y síntesis de inmunoglobulinas (5) y quimioatracción de linfocitos T (6). Esta redundancia se explica por el uso común dentro de sus receptores funcionales del complejo de señalización IL-2Rβ/γ.

20

Este complejo IL-2Rβ/γ es un receptor de afinidad intermedia común para la IL-2 y la IL-15 (Kd = 1 nM), y ambas citoquinas compiten por la unión a este receptor (7). La especificidad de la citoquina la confieren las cadenas privadas adicionales, IL-2Rα e IL-15Rα que están estructuralmente relacionadas (8). Estas dos cadenas contienen dominios estructurales (llamados dominios sushi) encontrados previamente en algún complemento y moléculas de adhesión (9). El IL-2Rα contiene dos de dichos dominios, mientras que IL-15Rα contiene solo uno. Una diferencia destacable es que la IL-2 se une a su IL-2Rα específico con una afinidad (Kd = 10 nM) mucho menor que la IL-15 al IL-15Rα (Kd = 0,05 nM). Cada cadena específica se puede asociar con el complejo IL-2Rβ/γ para formar un receptor de alta afinidad funcional (αβγ), específico de citoquina (10-12).

25

Debido a que comparten este complejo IL-2Rβ/γ, ambas citoquinas desencadenan rutas de señalización corriente abajo similares, que incluyen la activación de las tirosina quinasas Jak-1/Jak-3 y posterior translocación nuclear de Stat-3 y Stat-5 fosforilados, activación de tirosina quinasas Lck y Syk, activación de la ruta de MAP quinasa, e inducción de Bcl-2 (13, 14). A diferencia de IL-2Rβ e IL-2Rγ que son necesarios para la transducción de señales, los receptores específicos IL-2Rα e IL-15Rα tienen colas intracelulares cortas (13 y 41 aminoácidos respectivamente) y se considera que el IL-2Rα tiene una función en la transducción de señales. Aunque los estudios iniciales han señalado la función prescindible de la cola intracelular de IL-15Rα en la señalización (8), datos más recientes sugieren que el IL-15Rα puede mediar algunas funciones intracelulares (15-17).

30

[0004] En contraste con la redundancia de la función general observada in vitro, algunos hallazgos señalan a acciones complementarias e incluso opuestas de la IL-2 e IL-15 in vivo. Realmente, mientras que la expresión del gen de IL-2 y de IL-2Rα está restringida principalmente al compartimento de linfocitos T activados, los transcritos de IL-15 y de IL-15Rα son expresados por diferentes tipos de células y tejidos (monocitos, células dendríticas y del estroma, queratinocitos, placenta, músculo esquelético, corazón), sugiriendo funciones adicionales para el sistema de la IL-15 además del sistema inmunitario (7, 8). Se han descrito células que expresan el IL-15Rα en ausencia de IL-2Rβ y/o IL-2Rγ y algunas de ellas responden a la IL-15 (17, 18), sugiriendo la existencia de nuevos complejos receptores funcionales de IL-15 no implicados en IL-2Rβ y/o IL-2Rγ.

35

[0005] También se han sugerido distintas funciones para la IL-2 e IL-15 a partir de experimentos en ratones con genes inactivados. Mientras que los ratones IL-2^{-/-} e IL-2Rα^{-/-} desarrollan expansión de linfocitos T y B exacerbada, asociada con manifestaciones autoinmunitarias, los ratones IL-15^{-/-} y IL-15Rα^{-/-} por el contrario tienen poblaciones de linfocitos T y B normales y presentan una deficiencia grande de linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos intraepiteliales y linfocitos T de memoria CD8⁺ (19, 20). Un estudio reciente sugiere que, al contrario de los resultados obtenidos in vitro, la función principal de la IL-2 in vivo es limitar la

40

expansión continua de los linfocitos T activados, mientras que la IL-15 es crítica para iniciar la división de linfocitos T (21).

5 **[0006]** Una serie de estudios han contribuido a la identificación de trastornos humanos en los que tiene una relevancia clínica y un potencial beneficio el dirigirse al sistema de IL-15. Entre ellos, hay enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, enfermedades infecciosas, rechazo de trasplantes, cáncer e inmunodeficiencias (22, 23). En este contexto, el diseño racional de agonistas y antagonistas del sistema de IL-15/receptor es un problema importante y requiere un conocimiento preciso de la estructura del complejo del receptor de IL-15 de alta afinidad.

10 **[0007]** Una serie de estudios de mutagénesis de IL-2 humana y murina han conducido a la identificación de varios restos implicados en la unión a las cadenas IL-2R α , β y γ . A partir de estos estudios, los restos K35, R38, F42 y K43, todos situados en el bucle A-B de la IL-2 humana, están implicados en su unión a la cadena IL-2R α , mientras que los restos D20 en la hélice A y N88 en la hélice C están implicados en la unión a la cadena IL-2R β , y Q126 en la
15 hélice D es crucial para la unión a la cadena IL-2R γ (24-26). Se identificaron regiones similares en la IL-2 de ratón (27).

[0008] Por el contrario, hay muy pocos datos disponibles en relación con los restos en la IL-15 implicados en la unión a los diferentes receptores de la IL-15.

20 **[0009]** Algunas mutaciones en la IL-15 humana (D8 y Q108) que son análogas a las descritas para la IL-2 humana, sugieren que las correspondientes regiones en la IL-15 están implicadas en la unión a las subunidades IL-2R β y γ , respectivamente (28).

25 **[0010]** La presente invención sigue diferentes procedimientos complementarios, incluyendo el análisis de interacción de ligando y receptor, la inducción de la actividad biológica, barrido de péptidos, y mutagénesis dirigida, para definir el epítipo de la IL-15 responsable de la unión de alta afinidad a la cadena IL-15R α .

RESUMEN DE LA INVENCION:

30 **[0011]** La presente invención describe un epítipo de la IL-15 humana responsable de la unión de alta afinidad a la cadena IL-15R α . Este epítipo de IL-15/IL-15R α consiste esencialmente en dos péptidos: el péptido 1 (₄₄LLELQVISL₅₂; SEQ ID NO: 4 en la Figura 1B) que está situado en la hélice B de la IL-15, y el péptido 2 (₆₄ENLII₆₈; SEQ ID NO: 6 en la Figura 1B) o el péptido 2a (₆₄ENLIII₆₉; SEQ ID NO: 67 en la Figura 1B) que están situados en la
35 hélice C.

En la presente solicitud, todos los números de restos se cuentan con referencia a la secuencia entera de la proteína de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 2 mostrada en la Figura 1A). El péptido 1 y el péptido 2 o 2a juntos configuran una superficie epitópica que es responsable de la unión de alta afinidad de la IL-15 al IL-15R α . Los
40 péptidos 2 y 2a también están implicados en el reclutamiento de la subunidad de transducción IL-2R β

[0012] La presente invención también describe agonistas y antagonistas de la IL-15, y más en particular agonistas y antagonistas de la IL-15 que derivan de dichos péptidos epitópicos por mutación (véase las Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 9, 10).

45 **[0013]** La invención se define por las reivindicaciones.

[0014] Los agonistas descritos en el presente documento incluyen aquellas muteínas de la IL-15 en las que al menos uno de L45, S51 y L52 se ha sustituido por un grupo cargado (D, E, R o K); véase las figuras 2A y 2C. Un
50 agonista particularmente preferido comprende L45 sustituido por D o E y/o S51 sustituido por D, y/o L52 sustituido por D: estas muteínas de IL-15 presentan propiedades de unión y biológicas superiores que las de la IL-15 natural, y por lo tanto se comportan como superagonistas. Son herramientas particularmente valiosas para expandir subgrupos de linfocitos (p. ej., linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos T de memoria CD8⁺) y son útiles como agentes terapéuticos en pacientes con cáncer o inmunodeficiencias.

55 **[0015]** Los antagonistas descritos en el presente documento incluyen aquellas muteínas de IL-15 en las que al menos uno de E64, I68, L69 y N65 se ha sustituido por un grupo con carga opuesta (K o R) o por un grupo cargado (D, E, R o K); véase las figuras 2B y 2D. Un antagonista particularmente preferido comprende N65 mutado

por un grupo cargado (D, E, R o K), tal como K. Estas muteínas son antagonistas o antagonistas potenciales, y por lo tanto pueden ser útiles en afecciones o enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide y la reacción de Shwartzman generalizada, en la que se cree que la IL-15 tiene una función importante (22).

5 **[0016]** La presente invención también se refiere a los ácidos nucleicos que codifican estas muteínas de IL-15, a los vectores de transfección y a células huésped que contienen dicho ácido nucleico, así como a un procedimiento para el cribado de agonistas y antagonistas de la IL-15.

[0017] Las aplicaciones biológicas o médicas de estos péptidos epitópicos y muteínas, tales como fármacos
10 que contienen dichas muteínas, también están dentro del alcance de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

[0018]

15 - La figura 1A muestra:

- la secuencia génica de la IL-15 humana (SEQ ID NO: 1) y sus posiciones de inicio y parada de la CDS,

20 ○ la secuencia de la proteína IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 2); se muestran en negrita el péptido 1 (de L44 a L52), péptido 2 (de E64 a I68) y péptido 2a (de E64 a L69),

- La figura 1B muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos del péptido 1 L44-L52 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO:4, respectivamente), y las secuencias de ADN y de aminoácidos del péptido 2 E64-I68 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:6, respectivamente), y las secuencias de ADN y de aminoácidos del péptido 2a E64-L69 (SEQ ID NO: 66 y SEQ
25 ID NO:67, respectivamente),

- La figura 2A muestra la secuencia del péptido 1 (L44-L52; SEQ ID NO: 4), y algunas muteínas que derivan del mismo que tienen actividad agonista de IL-15 (SEQ ID NO: 7-18),

30 - La figura 2B muestra la secuencia del péptido 2 (E64-I68; SEQ ID NO: 6), y algunas muteínas que derivan del mismo (SEQ ID NO: 19-28) que son antagonistas o agonistas parciales de la IL-15,

- La figura 2C muestra la secuencia de algunas muteínas de la IL-15 de la invención, que derivan de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 45 (SEQ ID NO: 29-32), o el resto 51 (SEQ ID NO: 33-36), o el resto 52
35 (SEQ ID NO: 37-40),

- La figura 2D muestra la secuencia de algunas muteínas de la IL-15 de la invención, que derivan de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 64 (SEQ ID NO: 41-42), o el resto 65 (SEQ ID NO: 43-46), o el resto 68
40 (SEQ ID NO: 47-50),

- Las figuras 3A y 3B ilustran el análisis de la unión de sIL-15R α -IL-2 a péptidos de 12 miembros de la IL-15:

45 ○ Figura 3A: péptidos de 12 miembros que abarcan la secuencia de aminoácidos entera de la IL-15 se inmovilizaron en placas de múltiples pocillos, y se ensayó su reactividad con las diferentes moléculas indicadas. El lado izquierdo de cada subpanel corresponde al péptido de 12 miembros N-terminal de la IL-15. Se incubaron la proteína de fusión sIL-15R α -IL-2 (20 μ g/ml, es decir 330 nM) o la rIL-2 (5 μ g/ml, es decir 330 nM) y su unión se puso de manifiesto con el anticuerpo de cabra dirigido contra IL-2 humana AF-202-NA más un anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de cabra acoplado a peroxidasa. La reactividad de cada pocillo
50 (eje de ordenadas, escala arbitraria) se mide como se describe en los procedimientos experimentales.

- Figura 3B: las regiones del péptido de la IL-15 humana reconocidas por sIL-15R α -IL-2 se sitúan en la estructura primaria de la IL-15. Se muestran las 4 hélices alfa.

- Las figuras 4A, 4B y 4C ilustran la determinación de las afinidades de FLAG-IL-15 y mutantes para IL-15R α por
55 estudios de unión de competición: se equilibraron células TF-1 con una concentración fija (80 pM) de [¹²⁵I]-rIL-15 y concentraciones crecientes (como se indica en el eje de abscisas) de FLAG-IL-15 natural (WT) o mutantes.

- Figura 4A: WT (■), L45D (◆), L45E(◇), E46K (▲)

○ Figura 4B: WT (■) Q48K (□), V49D (◆), 150D (◇), S51D (▲), L52D (Δ)

○ Figura 4C: WT (■), E64K (□), N6SK (◆), L66D (◇), L66E (▲), 167D (Δ), I67E (●), I68D (○),

5 - Las figuras 5A, 5B, 5C ilustran las actividades proliferativas de FLAG-IL-15 y mutantes en células TF-1β: las células TF-1β se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes (indicadas en el eje de abscisas) de FLAG-IL-15 natural (WT) o mutantes. La proliferación celular se evaluó midiendo la incorporación de [³H]-timidina.

10 ○ Figura 5A: WT (■), IA4D (□), L45D (◆), L45E (◇), E46K (▲), LA7D (Δ),

○ Figura 5B: WT (■) Q48K (□), V49D (◆), I50D (◇), S51D (▲), L52D (Δ),

○ Figura 5C: WT (■), E64K (□), N65K (◆), L66D (◇), L66B (▲), I67D (Δ), I67E (●), I68D (○),

15 - La figura 6 ilustra la determinación de las afinidades de Flag-IL-15 y mutantes por el IL-15Rα mediante ensayos de unión de competición. Las células TF1 se equilibraron con una concentración fija (80 pM) de ¹²⁵I-rIL-15 y concentraciones crecientes de Flag-IL-15 natural o L69R y E46K mutantes. La unión celular de la rIL-15 específica se calculó y se representó gráficamente como se describe en la figura 4A,

20 - La figura 7 ilustra las actividades proliferativas de Flag-IL-15 y mutantes en células TF-1β. Las células TF-1β se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de FLAG-IL-15 natural o mutante (L69R). La proliferación celular se evaluó midiendo la incorporación de [³H]-timidina. Las desviaciones típicas son bajas y están escondidas por los símbolos.

25 - La figura 8 ilustra el efecto del mutante de Flag-IL-15 N65K en la proliferación inducida por la IL-15 de células TF-1β en presencia de A41. La proliferación celular se evaluó midiendo la incorporación de [³H]-timidina. Las células se cultivaron en presencia de mAb dirigido contra IL-2Rβ A41 66 nM, con una concentración fija de r-IL-15 10 pM (control) y concentraciones crecientes de Flag-IL-15N65K purificada por afinidad. Se preparó un control negativo por purificación por afinidad de medio condicionado de células 293-EBNA no transfectadas y se introdujo en el ensayo biológico con las mismas diluciones que Flag-IL-15N65K.

- La figura 9 muestra la secuencia del péptido 2a (E64-L69; SEQ ID NO: 67), y algunas muteínas derivadas del mismo (SEQ ID NO: 68-81) que son candidatos de antagonistas de la IL-15 (agonistas parciales),

35 - La figura 10 muestra la secuencia de algunas muteínas de la IL-15 de la invención, que derivan de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 69 (SEQ ID NO: 82-85).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

40 **[0019]** La presente invención describe la identificación de un epítipo en la IL-15 que es responsable de la unión de alta afinidad a la cadena IL-15Ralfa. Este epítipo está formado esencialmente por dos péptidos: el péptido 1 de SEQ ID NO: 4, y el péptido 2 de SEQ ID NO: 6 o el péptido 2a de SEQ ID NO: 67 (véase la figura 1B). En la IL-15 natural madura humana, el péptido 1 está situado en la hélice B; el péptido 2 y péptido 2a están situados en la hélice C (véase la figura 3B).

45 **[0020]** La mutagénesis dirigida del péptido 1 y péptidos 2 y 2a muestra que estos péptidos están implicados en la unión a IL-15Ralfa.

50 **[0021]** Sorprendentemente, las mutaciones en las posiciones L45, S51 y L52 (péptido 1) no producen una reducción sino un aumento de la unión y la bioactividad, de modo que los mutantes resultantes se comportan como superagonistas. Son herramientas valiosas para expandir subgrupos de linfocitos (p. ej., linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos T de memoria CD8⁺), y pueden ser útiles como agentes terapéuticos en pacientes con cáncer o inmunodeficiencias.

55 **[0022]** La mutagénesis dirigida de los péptidos 2 y 2a muestra que los péptidos 2 y 2a participan tanto en la unión a IL-15Ralfa como a IL-2Rbeta, y que todos los aminoácidos de los péptidos 2 y 2a (E64 a I68 y L69) están implicados en este procedimiento. L66 e I67 aparentemente están implicados más en particular en la unión de la IL-15 a IL-15Ralfa, mientras que E64, N65, I68 y L69 aparentemente están implicados más en particular en el

reclutamiento de IL-15Rbeta. Las mutaciones en las posiciones E64, N65, I68 y L69 inducen propiedades que designan a los mutantes resultantes como potenciales antagonistas de la IL-15; más en particular, se comportan como antagonistas de IL-15 (N65) o agonistas parciales (E64, I68, L69). Pueden ser útiles en enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide y reacción de Shwartzman generalizada.

5

[0023] Los compuestos que interfieren con la unión de estos péptidos epitópicos de IL-15 al IL-15Ralfa pueden actuar como agonistas o antagonistas de la IL-15. Puesto que la cadena IL-15Ralfa es la subunidad que confiere la especificidad del complejo receptor IL-15R por la IL-15 comparado con la IL-2, dichos agonistas y antagonistas son particularmente ventajosos en términos de especificidad.

10

La presente solicitud describe dichos compuestos agonistas y antagonistas, y describe en concreto muteínas que tienen dichos efectos agonistas o antagonistas.

[0024]

15

Los términos agonista y antagonista en el presente documento se dan con su significado habitual en el campo.

[0025]

20

Un compuesto se denomina agonista de la IL-15 cuando induce una respuesta biológica que es similar o de nivel superior que la inducida por la IL-15 nativa. Los agonistas preferidos son aquellos que inducen un nivel de respuesta biológica incluso mayor (superagonista).

Un agonista de la IL-15 normalmente tiene una afinidad por la unión al IL-15alfa que al menos no es significativamente diferente de aquella de la IL-15 nativa, y que preferiblemente es significativamente mayor que la de la IL-15 nativa.

[0026]

25

Un antagonista interfiere con la unión de la IL-15 a su receptor o cadena de receptor objetivo, de modo que antagonista la actividad biológica de la IL-15. Más en particular, un compuesto se denomina antagonista de la IL-15 cuando compete con la IL-15 nativa por la unión a su cadena de receptor objetivo IL-15Ralfa y/o IL-15Rbeta y/o IL-15Rgamma, y tras lo cual bloquea o inhibe significativamente la respuesta biológica inducida por dicha IL-15 nativa. Por lo tanto, los agonistas parciales en el presente documento están abarcados dentro del término "antagonista". Los candidatos a antagonistas son aquellos compuestos que tienen una afinidad por la unión al IL-15Ralfa y/o IL-15Rbeta y/o IL-15Rgamma que no es significativamente diferente, o es mayor que la de la IL-15 nativa, y que no inducen o inducen un nivel significativamente inferior de respuesta biológica que la IL-15 nativa.

30

[0027]

35

Dicha respuesta biológica es una respuesta biológica inducida por la IL-15. El experto en la materia puede elegir cualquier respuesta biológica inducible por la IL-15 que encuentre adecuado o conveniente para la evaluación o seguimiento.

La respuesta biológica inducible por la IL-15 típica es la proliferación de células sensibles a la IL-15, tales como p. ej., la línea de linfocitos T citotóxicos de linfoma de ratón CTL-L2 (número de acceso en ATCC TIB-214) o células TF1-beta.

40

[0028]

45

Las células TF-1 están disponibles en la American Type Culture Collection ATCC; 10801 University Blvd.; Manassas, Virginia 20110-2209; EE.UU.; cf. <http://www.lgcpromochem.com/atcc/> con el número de acceso en ATCC CRL-2003. Los moldes de cadena Beta están disponibles a partir del ARN de HuT102 (ATCC TIB-162) o clon E6.1 Jurkat (ATCC TTB 152) por RTPCR usando la polimerasa Pfu con actividad de corrección de pruebas (Stratagène n° 600390) y 5'GAGAGACTGGATGGACCC 3' como cebador de sentido directo (SEQ ID NO: 51), y 5' AAGAAACTAACTCTTAAAGAGGC3' como cebador de sentido contrario (SEQ ID NO: 52) de acuerdo con la secuencia del IL-2R beta humana (número de acceso en NCBI K03122). El producto de la PCR se clona eficazmente usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt (In Vitrogen n° cat. K2700-20) o el kit de clonación por PCR TOPO XL (In Vitrogen cat n° K4750-10). Después se subclona el ADNc para el gen del IL-2R beta en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión del retrovirus pLXRN del sistema de expresión retroviral Pantropic (BD Biosciences Clontech n° 631512) y se transfecta en células GP2-293, como se describe en el kit para generar retrovirus recombinantes. Los retrovirus recombinantes con IL-2R después se pueden usar para infectar células TF-1 para generar TF-1β después de selección en medio que contiene G418.

50

55

[0029]

El experto en la materia puede elegir alternativamente evaluar o seguir una respuesta biológica de la IL-15 que está más adelante en la ruta de señalización, tal como la activación de una tirosina quinasa (p. ej., Jak-1/Jak-3; Lck; Syk), activación de una MAP quinasa, o un suceso de translocación nuclear (p. ej. translocación de Stat-3 y/o Stat-5 fosforilados). La respuesta biológica puede ser entonces una respuesta acelular.

[0030] Por lo tanto, la presente solicitud describe 3 péptidos que son parte del epítipo en la IL-15 humana que es responsable de la unión de alta afinidad de la IL-15 a la cadena IL-15Ralfa. Tienen respectivamente la secuencia de la región de la IL-15 natural madura humana desde L44 a L52 (SEQ ID NO: 4), o la secuencia de la región de la IL-15 natural madura humana desde E64 a I68 (SEQ ID NO: 6), o la secuencia de la región de la IL-15 natural madura humana desde E64 a L69 (SEQ ID NO: 67); véase la figura 1B.

También se describen en el presente documento los ácidos nucleicos (ADN o ARN) que codifican dicho péptido epitópico. Los ácidos nucleicos de ejemplo incluyen los de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 66 (véase la figura 1B).

[0031] Los procedimientos para producir anticuerpos que se unen a un péptido o proteína dados son bien conocidos para los expertos en la materia, véase, p. ej., "Antibodies: a laboratory manual" / editado por Ed Harlow, David Lane, editorial Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. También se logra de forma rutinaria la producción de anticuerpos monoclonales, véase, p. ej., la técnica del hibridoma descrita por Köhler y Milstein 1975, *Nature* 256:495-497.

Estos procedimientos se pueden usar para la producción de anticuerpos, más en particular anticuerpos monoclonales, que se unen a un péptido epitópico y/o una muteína descritos en el presente documento.

Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con una proteína, véase, p. ej., "Antibodies: a laboratory manual" (editado por Ed Harlow, David Lane, editorial Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica. Así se pueden producir anticuerpos o anticuerpos monoclonales con una especificidad definida.

Los anticuerpos o anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL-15 ventajosos son los que tienen propiedades agonistas o antagonistas de la IL-15.

[0032] La presente invención se refiere a muteínas de IL-15 y fragmentos de muteínas de IL-15, que se pueden obtener de los péptidos epitópicos descritos en lo que antecede.

[0033] Por lo tanto, la presente solicitud se refiere a muteínas de IL-15, que comprenden una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por al menos una sustitución, eliminación o adición dentro de la región que se extiende del resto 44 al resto 52 (estando explícitamente incluidos todos los restos finales de dichas regiones), correspondiendo la numeración de los restos a (y manteniéndose como la de) la IL-15 natural madura humana, y caracterizada porque es un agonista de la IL-15, en el que dicha al menos una sustitución, eliminación o adición comprende la sustitución de al menos uno de los restos 45, 51, 52 por un aminoácido seleccionado de D, E, K, R. La presente solicitud también se refiere a una muteína de IL-15, caracterizada porque tiene una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por al menos una sustitución, eliminación o adición dentro de la región que se extiende desde el resto 64 al resto 69, correspondiendo esta numeración de los restos a la IL-15 natural madura humana, con la condición de que la muteína de IL-15 resultante de la misma tenga una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no sea significativamente diferente, o sea mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y caracterizado porque es un antagonista de la IL-15, en el que dicha al menos una sustitución, eliminación o adición comprende la sustitución de al menos uno de los restos 64, 65, 68, 69 por un aminoácido que se selecciona de:

- K, R para el resto 64,

- D, E, K, R para los restos 65, 68, 69.

Preferiblemente, la o las mutaciones son conservativas de la afinidad o potenciadoras de la afinidad, de manera que la muteína de IL-15 resultante de las mismas tenga una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no sea significativamente diferente, o sea superior a la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión a IL-15Ralfa.

Cuando se empieza por la IL-15 natural madura humana, los restos E64 e I50 preferiblemente no deben mutar ya

que tienden a inducir una reducción en la afinidad por IL-15Ralfa.

[0034] En el presente documento se describen muteínas equivalentes que se pueden obtener a partir de otra IL-15 natural madura, tal como en concreto una IL-15 natural madura animal pero no humana, y más en particular, una IL-15 natural madura de mamífero pero no humana, p. ej., la IL-15 de simio, ratón, rata, bovina, oveja, cerdo o perro.

[0035] La sustitución de las muteínas de IL-15 descritas en el presente documento, puede ser por ejemplo una sustitución de al menos una cadena lateral hidrófoba seleccionada de L, V e I, y/o de al menos una cadena lateral polar no cargada seleccionada de S, Q y N, por un grupo cargado seleccionada de D, E, R y K, y/o una sustitución de al menos una cadena lateral polar cargada seleccionada de B por un grupo con carga opuesta seleccionada de K y R.

[0036] La presente invención proporciona en concreto muteínas de IL-15 que son agonistas o superagonistas de la IL-15.

[0037] Dichas muteínas agonistas comprenden una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por sustitución de al menos uno de los restos 45, 51, 52. En la IL-15 natural madura humana, el resto 45 es L, el resto 51 es S y el resto 52 es L (véase la SEQ ID NO: 2 en la figura 1A).

[0038] La presente invención proporciona en particular muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 45 por D, E, K o R, preferiblemente por D o E. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 44 al resto 52 por la secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, p. ej. las muteínas de IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32, respectivamente (véase la figura 2C). Las muteínas agonistas más preferidas incluyen aquellas muteínas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30 (véase la figura 2C).

[0039] Otras muteínas agonistas de la IL-15 incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 51 por D, E, K o R, preferiblemente por D. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 44 al resto 52 por la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, p. ej. las muteínas de la IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36, respectivamente (véase la figura 2C). Las muteínas agonistas más preferidas incluyen aquellas muteínas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 33 (véase la figura 2C).

[0040] Otras muteínas preferidas más, agonistas de la IL-15 incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 52 por D, E, K o R, preferiblemente por D. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 44 al resto 52 por la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, p. ej. las muteínas de IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40, respectivamente (véase la figura 2C). Las muteínas agonistas más preferidas incluyen aquellas muteínas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 37 (véase la figura 2C).

[0041] La mutagénesis dirigida del péptido 1 muestra que L45, E46, V49, S51 y L52 están implicados en la unión a IL-15Ralfa, y que E46 es crucial, puesto que la sustitución de esta cadena lateral ácida por una básica (E46K) produce una pérdida completa de la unión de la IL-15 al IL-15Ralfa y de bioactividad. La mutación en la posición 150 (I50D) reduce mucho la capacidad de la IL-15 para unirse al IL-15Ralfa, así como para inducir proliferación celular. La sustitución de la cadena lateral hidrófoba de V49 por una cadena lateral con carga negativa (V49D) también produce una fuerte reducción (13 veces) de la afinidad de la IL-15 por el IL-15Ralfa. Por lo tanto las mutaciones del resto 46 ó 49 ó 50, tales como E46K or V49D o I50D, tienden a inducir una pérdida significativa en la afinidad de la unión. Por lo tanto, en general no son satisfactorias, al menos cuando se introducen como una mutación puntual.

[0042] La presente invención proporciona además muteínas de IL-15 que son candidatas a antagonistas o agonistas de la IL-15. Dichas muteínas antagonistas comprenden una secuencia que se puede obtener de la IL-15

natural madura humana por sustitución de al menos uno de los restos 64, 65, 68, 69.

En la IL-15 natural madura humana, el resto 64 es E, el resto 65 es N, el resto 68 es I, el resto 69 es L (véase la SEQ ID NO: 2 en la figura 1A).

5

[0043] Las muteínas antagonistas de la IL-15 preferidas incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 64 por K o R. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 64 al resto 68 por la secuencia de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, p. ej. las muteínas de IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42 (véase la figura 2D). Las muteínas antagonistas más preferidas incluyen aquellas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 41 (véase la figura 2D).

[0044] Otras muteínas antagonistas de la IL-15 preferidas incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 65 por D, E, K o R, preferiblemente por K. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 64 al resto 68 por la secuencia de SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24, p. ej. las muteínas de IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46, respectivamente (véase la figura 2D). Las muteínas antagonistas de la IL-15 más preferidas incluyen aquellas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 43 (véase la figura 2D).

[0045] Otras muteínas preferidas más, antagonistas de la IL-15 incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 68 por D, E, K o R, preferiblemente por K. Se incluyen en particular las muteínas de IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 64 al resto 68 por la secuencia de SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28, p. ej. las muteínas de la IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50, respectivamente (véase la figura 2D). Las muteínas antagonistas de la IL-15 más preferidas incluyen aquellas que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 47 (véase la figura 2D).

[0046] Otras muteínas preferidas más, antagonistas de la IL-15 incluyen aquellas muteínas que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución del resto 69 por D, E, K o R, preferiblemente por R. Se incluyen en particular las muteínas de la IL-15 que comprenden una secuencia que se puede obtener a partir de la IL-15 natural madura humana por sustitución de la región que se extiende desde el resto 64 al resto 69 por la secuencia de SEQ ID NO: 77 o SEQ ID NO: 78, o SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 (véase la figura 9), p. ej. las muteínas de la IL-15 de secuencia SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85, respectivamente (véase la figura 10).

[0047] La presente solicitud también se refiere a los ácidos nucleicos (ADN o ARN) que codifican las muteínas de IL-15 de la invención, contenidos opcionalmente en un vector, tal como un vector de transfección, un vector de expresión.

El ADN que codifica la muteína de IL-15 después se puede unir operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción o la traducción adecuada, tal como promotores o potenciadores transcripcionales, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica el ARNm de los sitios de unión al ribosoma adecuados, y secuencias adecuadas que controlan la transcripción e inicio y terminación de la traducción. Los ejemplos de dichos vectores incluyen pEF1/myc-His (In Vitrogen, V921-20), pcDNA3.1 (In Vitrogen, V800-20).

También puede unirse a una secuencia líder que permite la secreción extracelular mejorada del polipéptido traducido.

Los ejemplos de dichas secuencias líder incluyen las secuencias Kozak y secuencias líder de una pre-prolactina de rata (número de acceso en NCBI AF022935, nucleótidos 178 a 270; véase. www.ncbi.nlm.nih.gov; National Center for Biotechnology Information, U.S. National library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, EE.UU.).

[0048] Los vectores de expresión recombinantes que llevan la secuencia codificante estructural de la muteína de IL-15 recombinante, después se pueden transfectar para la transformación en una célula huésped.

- Las células huésped adecuadas para la expresión de una muteína de IL-15 incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Las procariotas incluyen por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y varias otras especies dentro del género de *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Los ejemplos de células huésped adecuadas también incluyen
- 5 levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, una línea celular de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO), p. ej. la línea de células de ovario de hámster chino CHO/dhfr- (CHO duk) (ATCC n° CRL-9096), o tales como líneas de células epiteliales, p. ej., la línea de células epiteliales de simio COS-7 (ATCC n° CRL 1651), o líneas celulares humanas, p. ej., la línea de células renales humana 293 c18 (ATCC n° CRL-10852) o la línea de células renales humana FreeStyle 293-F (In Vitrogen n° R790-07).
- 10
- [0049]** Los vectores de expresión y clonación adecuados para usar con un huésped celular bacteriano, de insecto, levadura y mamífero, se describen por ejemplo, en Pouwels y col. Cloning Vectors: A laboratory Manual, Elsevier, N.Y. 1985.
- 15 **[0050]** La presente solicitud también describe el fragmento conservativo de la muteína de IL-15 de la invención. Dichos fragmentos conservativos de la muteína de IL-15 comprenden la región 44-52 mutada y/o la región 64-68 mutada y/o la región 64-69 mutada, y ha retenido una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no es significativamente diferente, o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa.
- 20 En una realización, la presente solicitud se refiere a un fragmento de un agonista de la IL-15 como se ha definido en lo que antecede, que todavía comprende la región 44-52 mutada y que todavía tiene una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no es significativamente diferente, o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, que todavía es un agonista de la IL-15.
- 25 Dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-18, por ejemplo el péptido de la SEQ ID NO: 7 (L45D), o SEQ ID NO: 8 (L45E), o SEQ ID NO: 11 (S51D), o SEQ ID NO: 15 (L52D); véase la figura 2A.
- 30 En otra realización, la presente solicitud se refiere a un fragmento de un antagonista de la IL-15 como se define en lo que antecede, que todavía comprende la región 64-69 mutada, y que todavía tiene una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no es significativamente diferente, o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y que todavía es un antagonista de la IL-15.
- 35 Dicho fragmento puede comprender, por ejemplo, la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 19-28, 77-80 (véase las figuras 2B y 9). Por ejemplo, los péptidos de SEQ ID NO: 19 (E64K), SEQ ID NO: 25 (I68D) o SEQ ID NO: 80 (L69R) se comportan como agonistas parciales; la SEQ ID NO: 80 (L69R) induce una respuesta máxima que es tan baja como 2% de la actividad de la IL-15 natural. El péptido de SEQ ID NO: 23 (N65K) se comporta como un antagonista (inhibición total de la actividad de la IL-15 con la muteína N65K 100 pM; véase el ejemplo 2 a
- 40 continuación y la figura 8).
- [0051]** De forma similar a lo descrito antes para las muteínas de la invención, la presente solicitud también abarca en su alcance el ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica los fragmentos de muteínas de IL-15 de la invención contenidos opcionalmente en un vector, así como cualquiera de dichos vectores, y cualquier célula
- 45 huésped que contenga dicho ácido nucleico.
- [0052]** Las muteínas de la invención se pueden producir por cualquier medio que el experto en la materia puede encontrar adecuado, tal como, p. ej., la síntesis química de péptidos o la biosíntesis de péptidos.
- 50 **[0053]** La síntesis química de péptidos ahora es una rutina (véase, p. ej., Andersson y col., 2000, *Biopolymers* (Peptide Science) 55: 227-250), y hay muchas empresas especializadas en dicha síntesis.
- [0054]** Preferiblemente, los fragmentos de muteína de la presente invención se sintetizan por técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) usando protocolos de FMOC estándar (Véase, p. ej., Carpino y col., 1970, *J. Am. Chem. Soc.* 92(19):5748-5749; Carpino y col., 1972, *J. Org. Chem.* 37(22):3404-3409).
- 55 **[0055]** Alternativamente, el experto en la materia puede elegir producir las muteínas o fragmento de muteínas de forma biológica por traducción in vitro o in vivo de un casete de expresión mutado de la IL-15 natural por mutagénesis dirigida (Sodoyer, 2004, *Biodrugs*, 18 (1): 51-62).

Se describe una ilustración de esto en el ejemplo a continuación.

Por lo tanto, el cambio de aminoácido se puede llevar a cabo por cualquier medio de mutagénesis disponible para la
 5 persona experta, p. ej., usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.).
 El casete de expresión mutado después se puede transfectar a células huésped tales como células 293 c18 (ATCC
 n°10852) (Invitrogen, Leek, Países Bajos). Después, las células transfectadas se pueden cultivar para así expresar
 el casete mutado (las células 293 c18 se pueden cultivar, p. ej., en DMEM que contiene FCS al 10%, glutamina 2
 mM, glucosa 1 mg/ml y geneticina 250 µg/ml). Después, el producto de expresión mutado se puede recuperar y
 10 purificar opcionalmente (p. ej., recoger los líquidos sobrenadantes del cultivo y purificación de los mismos).

[0056] Un procedimiento para producir una muteína de IL-15 o un fragmento de muteína de IL-15 descrito en
 el presente documento, comprende p. ej.:

15 - proporcionar un ácido nucleico de acuerdo con la invención, que codifica dicha muteína o fragmento de muteína,
 estando dicho ácido nucleico opcionalmente dentro de un vector de expresión,

- introducir de forma operativa dicho ácido nucleico en una célula huésped de modo que produzca el producto de
 expresión del mismo,

20 - recuperar dicho producto de expresión.

[0057] La muteína de IL-15 se puede concentrar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en
 el comercio, tal como una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

25 La muteína expresada resultante opcionalmente concentrada, después se puede purificar del medio de cultivo o
 extractos. El medio de cultivo o extracto celular se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de
 cromatografía hidrófobo, o una resina de intercambio aniónico. Después la concentración se puede aumentar por
 RP-HPLC.

30 **[0058]** La muteína concentrada también se puede purificar por su marcador FLAG N-terminal en una columna
 de inmunoafinidad con el anticuerpo M2 dirigido contra FLAG injertado (producto Sigma n° A 2220).

Se pueden añadir otros marcadores (p. ej., marcador de polihistidina) por ingeniería genética a los extremos N o C
 35 terminales de las muteínas con el fin de ayudar al procedimiento de purificación.

[0059] La presente solicitud también se refiere a aplicaciones biológicas y médicas de las muteínas de IL-15 y
 los fragmentos de muteínas de IL-15 de la invención, sea en su expresión de aminoácidos o en su versión de ácido
 nucleico codificante.

40 **[0060]** Las muteínas agonistas de la invención son útiles para expandir subgrupos de linfocitos, tales como
 subgrupos de T/NK particulares. Por lo tanto, la presente invención describe su uso como un agente para expandir
 una o varias poblaciones de linfocitos, tales como linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales,
 células CD8+ de memoria, y a una composición o kit dirigido a dicho uso que comprende dicha muteína agonista.

45 **[0061]** La presente invención se refiere en particular a un fármaco o vacuna, que comprende una muteína de
 IL-15 o fragmento de muteína de IL-15 de la invención, y opcionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente y/o
 adyuvante farmacéuticamente aceptable.

50 Dicho fármaco o vacuna se dirige a la prevención y/o tratamiento y/o alivio de una afección o enfermedad en la que
 se desea una reducción o aumento de la actividad de la IL-15.

Una serie de estudios han contribuido a la identificación de trastornos en los que el dirigirse al sistema de IL-15 tiene
 importancia clínica y potencial beneficio. Entre ellos están las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias,
 55 enfermedades infecciosas, rechazo de trasplante, cáncer e inmunodeficiencias (véanse las referencias bibliográficas
 22, 23).

[0062] La presente solicitud se refiere en particular a un fármaco o vacuna que comprende una muteína de
 IL-15 o fragmento de muteína de IL-15 de la invención, que es un agonista de la IL-15 de la invención, y

opcionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Dicho fármaco o vacuna se dirige a la prevención y/o tratamiento y/o alivio de una afección o enfermedad en la que se desea un aumento de la actividad de la IL-15, tal como en concreto en el cáncer o inmunodeficiencia. Dicho fármaco o vacuna puede actuar estimulando la proliferación y/o supervivencia de linfocitos (tales como linfocitos T, linfocitos T CD8⁺, linfocitos citotóxicos naturales, células dendríticas) y/o su actividad contra células tumorales.

[0063] La presente solicitud se refiere en particular a dicho fármaco que comprende una muteína de IL-15 o fragmento de muteína de IL-15 de la invención, que es un antagonista de la IL-15 de la invención, y opcionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Dicho fármaco se dirige a la prevención y/o tratamiento y/o alivio de una afección o enfermedad en la que se desea una reducción de la actividad de la IL-15, tal como enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide y reacción de Shwartzman generalizada.

[0064] La presente solicitud se refiere además a un procedimiento para cribar un agonista o antagonista de la IL-15, que comprende:

i. proporcionar una pluralidad de muteínas de IL-15 y/o fragmentos de muteínas de IL-15 de acuerdo con la invención,

ii. comparar sus afinidades de unión respectivas por el IL-15Ralfa con la afinidad de unión de la IL-15 natural madura,

iii. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos de muteínas que tienen una afinidad de unión que no es significativamente diferente, o que es mayor que la de la IL-15 natural madura.

[0065] Para cribar un agonista de la IL-15, el procedimiento puede comprender además:

iv. seleccionar al menos una actividad detectable inducible por la IL-15,

v. comparar el nivel de dicha actividad que es inducida en respuesta a las muteínas o fragmentos seleccionados en la etapa iii., con el inducido por la IL-15 natural madura,

vi. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos que inducen un nivel de actividad que no es significativamente diferente, o que es mayor que el de la IL-15 natural madura.

[0066] Para cribar un antagonista de la IL-15, se caracteriza porque comprende además:

iv. seleccionar al menos una actividad detectable inducible por la IL-15,

v. comparar el nivel de dicha actividad que es inducida en respuesta a las muteínas o fragmentos seleccionados en la etapa iii., con el inducido por la IL-15 natural madura,

vi. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos que inducen un nivel de actividad que es menor que el de la IL-15 natural madura, o que no inducen nivel de actividad detectable.

[0067] La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Se entienden solo para propósitos ilustrativos.

EJEMPLO 1:

Procedimientos experimentales

Citoquinas y anticuerpos

[0068] La IL-3 murina recombinante y el GM-FSC humano se adquirieron en Rod Systems (Abington, Reino Unido), la IL-15 recombinante humana (rIL-15) se adquirió en Peprotech Inc (Rocky Hill, NJ) y la IL-2 recombinante humana (rIL-2) en Chiron (Emeryville, CA). El anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IL-2 humana AF-202-NA

se adquirió en R&D Systems y el mAb de ratón dirigido contra IL-2 humana IL2.66 era de Immunotech (Marseille, Francia). El anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IL-15R α humano M161 lo proporcionó generosamente GenMab A/S (Copenhague, Dinamarca) [para los experimentos descritos a continuación se puede usar alternativamente el anticuerpo policlonal AF247 (R&D Systems Inc., Minneapolis, EE.UU.)], y el mAb de ratón dirigido contra FLAG M2 conjugado con peroxidasa se adquirió en Stigma (Saint Quentin Fallavier, Francia).

Cultivo celular

[0069] La línea de células humanas TF-1 no adherentes está disponible en la American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd.; Manassas, Virginia 20110-2209; EE.UU.), y tiene un número de acceso en ATCC CRL-2003 (véase, <http://www.1gcpromochem.com/atcc/>). Las células humanas TF-1 β están disponibles por transfección operativa de células TF-1 con cadenas beta de modo que las células TF-1beta que resultan de las mismas proliferan en respuesta a la IL-15 (véase la referencia bibliográfica 29).

15 Los moldes de cadena beta están disponibles a partir del ARN de HuT102 (ATCC TIB-162) o clon E6.1 Jurkat (ATCC TIB 152) por RTPCR usando la polimerasa de Pfu con actividad de corrección de pruebas (Stratagène n° 600390) y 5'GAGAGACTGGATGGACCC 3' como cebador de sentido directo (SEQ ID NO: 51), y 5' AAGAAACTAACTCTTAAAGAGGCC3' como cebador de sentido contrario (SEQ ID NO: 52) de acuerdo con la secuencia del IL-2R beta humana (número de acceso en NCBI K03122). El producto de la PCR se clona eficazmente usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt (In Vitrogen n° cat. K2700-20) o el kit de clonación por PCR TOPO XL (In Vitrogen cat n°K4750-10). Después se subclona el ADNc para el gen del IL-2R beta en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión retroviral pLXRN del sistema de expresión retroviral Pantropic (BD Biosciences Clontech n° 631512) y se transfecta en células GP2-293, como se describe en el kit para generar retrovirus recombinantes. Los retrovirus recombinantes del IL-2R después se pueden usar para infectar células TF-1 para generar TF-1 β después de selección en medio que contiene G418.

[0070] La línea de células duk CHO adherentes está disponible en la ATCC (CHO/dhfr⁻; número de acceso CRL-9096).

30 **[0071]** Todas las células se cultivaron en CO₂ al 5% a 37°C en atmósfera saturada con agua. La línea de células humanas TF-1 no adherentes, células humanas TF-1 β y línea de células duk CHO adherentes se cultivaron en un medio RPMI 1640 que contenía suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% (FCS), glutamina 2 mM, y reaccionantes específicos como sigue: GM-CSF (TF1) 1 ng/ml, GM-CSF 1 ng/ml y geneticina 250 mg/ml (TF-1 β), adenosina, desoxiadenosina y timidina 10 mg/ml (Dhfr⁻ CHO duk). La línea de células murinas CTLL-2 no adherentes, se cultivó en un medio RPMI 1640 que contenía FCS al 8%, glutamina 2 mM, rIL-2 15 ng/ml y 2-mercaptoetanol 50 mM. Las células humanas 293 c18 adherentes (Invitrogen, Leek, Países Bajos) se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10%, glutamina 2 mM, glucosa 1 mg/ml y geneticina 250 mg/ml.

Preparación de la proteína de fusión IL15R α -IL-2 soluble

40 **[0072]** Los moldes de IL-15R α humano están disponibles por RT-PCR a partir del ARN de células TF-1 (número de acceso en ATCC CRL- 2003) o de monocitos humanos normales purificados de la sangre, usando la polimerasa de Pfu con actividad de corrección de pruebas (Stratagène n° 600390) y 5' AGTCCAGCGGTGCCTGTGG 3' como cebador de sentido directo - SEQ ID NO: 53 -, y 5' TCATAGGTGGTGAGAGCAGT 3' como cebador de sentido contrario - SEQ ID NO: 54 - de acuerdo con la secuencia de IL-15R α humana (número de acceso en NCBI U31628). El producto de la PCR se clona usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt (In Vitrogen n° cat. K2 700-20), para crear un plásmido pNo15R. Los moldes de IL-2 humana están disponibles por RT-PCR a partir del ARN del clon E6-1 de células Jurkat (número de acceso en ATCC TIB-152) estimuladas con el anticuerpo OKT3 y PMA (30), usando la polimerasa de Pfu con actividad de corrección de pruebas (Stratagène n° 600390) y 5' AACTGCAGGCACCTACTTCAAGTTCTAC 3' como cebador de sentido directo (*Pst* I subrayado) - SEQIDNO:55 -, y 5' TCCCCCGGGTCAAGTCAGTGTTGAGATG 3' como cebador de sentido contrario (*Sma* I subrayado) - SEQ ID NO: 56 -, de acuerdo con la secuencia de IL- 2 humana (número de acceso en NCBI NM000586). El producto de la PCR se clona en el plásmido bluescript (número de acceso en NCBI X52328) entre los sitios *Pst* I y *Sma* I, para crear un plásmido pBSSK-IL-2.

55 **[0073]** Para generar la construcción de IL15R α -IL-2 quimérica soluble, el péptido señal y el dominio extracelular de IL-15R α (nucleótidos 1-697) se amplificaron por PCR a partir de pNoR15, usando el cebador de sentido directo -SEQ ID NO: 57 - 5'-GGGAAGCTTAGTCCAGCGGTGTCCTGT- 3' (cebador 1, sitio de restricción

Hind III anidado subrayado) y el cebador de sentido contrario - SEQ ID NO: 58 - 5'-AACTGCAGAGTGGTGTGCTGTGGCC-3' (cebador 2, *Pst* I subrayado). Después, el producto amplificado se clonó entre los sitios *Hind* III y *Pst* I de pBSSK-IL-2.

- 5 **[0074]** En el gen híbrido final, el sitio *Pst*I (que codifica el dipéptido Leu-Gln) se comportaba como un conector entre las secuencias de IL-15R α (extremo 5') y de IL-2 (extremo 3'). Se controló la secuencia y la construcción quimérica se digirió del plásmido bluescript entre los sitios *Hind* III/*Not* I y se subclonó en el vector de expresión de mamífero pKCR6 (31) en el sitio *Eco* RI. Se transfectaron células CHO Dhfr⁻ con pKCR6-sIL-15R α -IL-2 usando el reactivo SuperFect (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Los clones que producían la proteína de fusión se detectaron usando un ELISA para la detección de IL-2 humana (BioSource, Nivelles, Bélgica). Se llevaron a cabo tres ciclos de clonación usando concentraciones crecientes de metotrexato (Sigma). Un clon seleccionado con metotrexato 5 μ M produjo aproximadamente 4,3 mg/l de sIL-15R α -IL-2. Los líquidos sobrenadantes se concentraron por precipitación con sulfato amónico al 60% de saturación, se cargaron en una columna de inmunoafinidad de IL-2 (mAb IL2.66), y la proteína de fusión de IL-2 se purificó como se ha descrito (32). Su concentración se determinó en el ELISA para IL-2 humana. Su pureza era al menos 80% con una masa molecular de 60 kDa, determinada por SDS-PAGE después de yodación con el procedimiento de la cloramina T como se ha descrito previamente (12). La funcionalidad completa de la parte de IL-2 de la proteína de fusión se demostró en el ensayo de proliferación de CTLL-2 (kit de proliferación celular II, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), usando rIL-2 como estándar. Se demostró una alta afinidad de unión de la IL-15 de la parte de IL-15R α usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

Producción de mutantes de IL-15

- [0075]** La construcción de expresión (humana) pEF-neo PPL SP-IL-15 se construyó en el vector pEF-1/myc-His (In Vitrogen, ref. V921-20). La secuencia del péptido señal de preprolactina de rata (PPL SP) se amplificó por RT-PCR del ARNm preparado en células GH4C1 (número de acceso en ATCC CCL-82.2) usando 5' GGGGTACCATCACCATGAACAGCCAAG 3' como cebador de sentido directo (sitio *Kpn* I subrayado) - SEQ ID NO: 59 - y 5' CGGGATCCGGTCTGCACATTTTGGCAG 3' como cebador de sentido contrario (sitio *Bam*H1 subrayado) - SEQ ID NO: 60 -, de acuerdo con la secuencia de preprolactina de *rattus norvegicus* (número de acceso en NCBI AF022935). La secuencia codificante de la IL-15 humana madura se amplificó por RT-PCR del ARNm de queratinocitos humanos normales preparados a partir de prepucio obtenido después de circuncisión, usando 5' CGGGATCCAACTGGGTGAATGTAATAAG 3' como cebador de sentido directo (sitio *Bam* H1 subrayado) - SEQ ID NO: 61 - y 5' GGAATTCTCAAGAAGTGTGGATGAAC 3' cebador de sentido contrario (sitio *Eco* R1 subrayado) - SEQ ID NO: 62 -, de acuerdo con la secuencia de IL-15 humana (número de acceso en NCBI NM000585). El PPL SP se introdujo entre los sitios *Kpn* I y *Bam* H1 de pEF-1/myc-His, y la IL-15 entre los sitios *Bam* H1 y *Eco* R1 de pEF-1/myc-His.

- [0076]** El marcador FLAG (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 63) se introdujo en el sitio *Bam*H1 entre el PPL SP y la secuencia codificante de la proteína IL-15 madura como un oligonucleótido bicatenario (SEQ ID NO: 64 = 5' - GATCGGACTACAAGGATGACGATGACAAGC - 3' y SEQ ID NO: 65 = 5' - GATCGCTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCC - 3'). Se generó un plásmido bluescript que contenía la secuencia PPL-FLAG-IL-15 subclonando el fragmento *Kpn* // *Eco* R1. Se llevó a cabo el cambio de aminoácidos usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA) con la construcción bluescript. Se confirmaron las secuencias a lo largo del ADNc híbrido de PPL-FLAG-IL-15 y el fragmento *Kpn* // *Eco* R1 mutado se volvió a clonar en pEF-1/myc-His. Para la producción de un mutante de FLAG-IL-15, se transfectaron $3,2 \times 10^6$ células 293 c18 adherentes con 16 μ g de la construcción de expresión de IL-15 mutada en una placa de 60 mm siguiendo un protocolo de fosfato de calcio estándar. Después de 6 h, el medio se sustituyó por DMEM completo reciente (Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia) y se recogieron los líquidos sobrenadantes 48 h después de transfección.

50 Análisis Pepscan

[0077] Los péptidos sintéticos que se superponían se sintetizaron y se cribaron usando tarjetas mini-PEPSCAN con formato de tarjeta de crédito (formato/tarjeta de 455 péptidos) descrito previamente (33).

- 55 Las tarjetas de polietileno del formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contienen los péptidos unidos covalentemente, se incubaron a 4°C durante la noche con las muestras (proteína de fusión IL-15R α -IL-2 soluble) diluidas en disolución de bloqueo que contenía suero de caballo al 5% (v/v) y ovoalbúmina al 5% (p/v). Después de lavar, las tarjetas se incubaron (1 h, 25°C) con el anticuerpo dirigido contra IL-2 humana AF-202-NA (1 μ g/ml), se lavaron y se volvieron a incubar con anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de cabra acoplado con peroxidasa 1,3

µg/ml (P 0160, DakoCytomation). Después de lavado, se añadió el sustrato de la peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-sulfonato (ABTS) más 2 µl/ml de H₂O₂ al 3%, y se cuantificó el desarrollo de color después de 1 h, usando una cámara con CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. El montaje consiste en una cámara con CCD y una lente de 55 mm (Cámara de vídeo CCD Sony XC-77RR, lente Nikon micro-nikkor 55 mm f/2,8), un adaptador de cámara (adaptador de cámara Sony DC-77RR) y el paquete de software de procesamiento de imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), funcionando en un sistema de ordenador Pentium II. La cámara con CCD está equipada con un filtro naranja que traduce el color verde del sustrato ABTS en valores de grises (escala arbitraria).

10 **Ensayos de unión de la IL-15**

[0078] La rIL-15 humana se radiomarcó con [¹²⁵I]-yodo (radiactividad específica de alrededor de 2000 cpm/fmol) usando el procedimiento de la cloramina T (34), y los experimentos de unión se realizaron como se ha descrito previamente (12). No se determinó unión específica en presencia de un exceso de 100 veces de citoquina sin marcar. Para los experimentos de unión de la IL-15, las células TF-1 se incubaron con concentraciones crecientes de rIL-15 marcado. El análisis de regresión de los datos de unión se llevó a cabo usando una ecuación de equilibrio de la unión de un solo sitio (Grafit, Erithacus Software, Staines, Reino Unido) y los datos se representaron en el sistema de coordenadas de Scatchard. Para los experimentos de inhibición de la IL-15, las células TF-1 se incubaron con una concentración fija de rIL-15 yodada y concentraciones crecientes de FLAG-IL-15 o mutantes o mAb. El análisis de regresión de los datos se llevó a cabo usando una ecuación logística de 4 parámetros (Grafit, Erithacus Software).

Ensayos de proliferación

[0079] La actividad de inducción de la proliferación de FLAG-IL-15 y de mutantes y la actividad inhibidora de los mAb se evaluaron por incorporación de [³H]-timidina en células TF-1β. Las células se mantuvieron en el medio de cultivo durante 3 días, se lavaron dos veces, y se dejaron sin nutrientes durante 2 h en el mismo medio sin citoquina. Se cultivaron en placa 10⁴ células en 100 µl y se cultivaron durante 48 h en el medio complementado con concentraciones crecientes de rIL-15, FLAG-IL-15 o mutante, o en el medio complementado con una concentración fija de rIL-15 y concentración creciente de mAb. Las células se pulsaron durante 16 h con [³H]-timidina 0,5 µCi/pocillo, se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se midió la radiactividad asociada a la célula.

Resultados

35 **Análisis de la unión del IL-15Rα a la IL-15 por un procedimiento de Pepsan**

[0080] Se usó un procedimiento de Pepsan para intentar identificar las regiones de la IL-15 implicadas en la unión del IL-15Rα. Para este propósito, se ensayó la unión de una proteína de fusión soluble (sIL-15Rα-IL-2) que consistía en el dominio extracelular del IL-15Rα humano fusionado con la IL-2 humana, a péptidos de IL-15 de 12 miembros, usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la IL-2 humana (AF-202-NA) como anticuerpo para ponerlo de manifiesto (Fig. 3A). Se observaron dos picos principales de reactividad que correspondían a la unión de sIL-15Rα-IL-2 con dos regiones diferentes de la secuencia de IL-15. Los experimentos de control con una concentración similar (330 nM) de rIL-2 dieron reactividad de fondo (Fig. 3A). Los estudios de Pepsan de péptidos de 30 miembros de la IL-15 humana confirmaron la reactividad de la sIL-15Rα-IL-2 con estas dos regiones de la IL-15. El análisis de los 2 conjuntos de péptidos (12 miembros y 30 miembros) asociados con la reactividad permitió asignar las siguientes secuencias como responsables de la unión de sIL-15Rα-IL-2: ₄₄LLELQV₅₂ (péptido 1; SEQ ID NO: 4) y ₆₄ENLII₆₈ (péptido 2; SEQ ID NO: 6). La primera secuencia está situada en la hélice B y la segunda secuencia en la hélice C (Fig. 3B).

50 **Mutagénesis dirigida de IL-15**

[0081] Con el fin de confirmar la implicación de las dos regiones peptídicas identificadas por Pepsan en la unión a la cadena de IL-15Rα, se llevaron a cabo mutaciones puntuales de la IL-15 en estas regiones. Con el fin de introducir una alteración sustancial en el supuesto sitio de unión al receptor, se sustituyeron cadenas laterales hidrófobas no polares (L, V, I) y cadenas laterales polares no cargadas (S, N, Q) por grupos cargados (D, E o K), y se sustituyeron cadenas laterales polares cargadas (E) por grupos con carga opuesta (K). Se generaron mutantes en las posiciones 44 a 52 (péptido 1) y las posiciones 64 a 68 (péptido 2). La IL-15 humana natural y los mutantes se expresaron como proteínas de fusión con un péptido FLAG N-terminal en células 293 c18. Después se ensayó la

capacidad de FLAG-IL-15 y de los mutantes para unirse al IL-15R α expresado por células TF-1 (Figuras 4A, 4B, 4C). Para este propósito, se usó un ensayo de competición que permitía comparar las eficacias de los diferentes mutantes para inhibir la unión de una concentración baja, no saturante, de rIL-15 radioyodado a las células TF-1. Las curvas de competición se muestran en las Fig. 4A, 4B, 4C y las concentraciones de mutantes que dan efectos de 50% de la inhibición máxima (CI50) se listan en la tabla I.

Tabla I

Proteínas FLAG-IL-15	CI ₅₀ (pM)	Actividad relativa (% del natural)
Natural	26,1	100
L44D	ND	NA
L45D	10,1	258 \pm 30
L45E	12,5	209 \pm 10
E46K	13314,7	0,20 \pm 0,01
L47D	ND	NA
Q48K	20,5	127 \pm 27
V49D	347,7	8 \pm 2
I50D	2949,8	0,88 \pm 0,45
S51D	11,6	225 \pm 36
L52D	10,9	239 \pm 5
E64K	18,2	143 \pm 43
N65K	26,6	98 \pm 26
L66D	190,9	14 \pm 8
L66E	407,1	6 \pm 2
I67D	104,8	25 \pm 6
I67E	63,7	41 \pm 9
I68D	20,2	129 \pm 28

[0082] TABLA I *Propiedades de unión de los mutantes de IL-15 en la línea celular TF-1*. ND: No determinado.
10 NA: No aplicable. Las desviaciones media y típica de las actividades relativas son de 3 experimentos independientes.

[0083] La FLAG-IL-15 inhibía la unión de la r-IL-15 marcada con una CI50 de 26 pM.

15 Las mutaciones en 3 posiciones (E46, V49 y 150) en el péptido 1 tenían efectos profundos en la afinidad de la IL-15, mientras que la mutación Q48K no tenía efecto. Las mutaciones en las posiciones L45 (L45D y L45E), S51 y L52 produjeron, de forma reproducible, un aumento (de 2 a 3 veces) de la afinidad de la IL-15 en este ensayo de competición. Los mutantes L44D y L47D no se pudieron evaluar en este ensayo debido a los niveles de producción demasiado bajos en los líquidos sobrenadantes de las células 293 c18. Algunas mutaciones en la región del péptido
20 2 (aquellas dirigidas a los restos L66 y 167) también reducían mucho la afinidad de la IL-15, mientras que las mutaciones en las posiciones E64, N65 y 168 no tenían efectos significativos.

[0084] Después se ensayaron los efectos de la FLAG-IL-15 natural y los mutantes en la promoción del crecimiento en las células TF-1 β sensibles a la IL-15 (Figuras 5A, 5B, 5C y tabla II).
25

Tabla II

Proteínas FLAG-IL-15	Inducción máxima (% del natural)	CE ₅₀ (pM)	Actividad relativa (% del natural)
Natural	100	6,0	100
L44D	0	>20,0	<30
L45D	100	1,7	353 ± 73
L45E	100	2,4	250 ± 21
E46K	>20	>1300,0	< 0,5
L47D	0	>60,0	<10
Q48K	100	4,8	125 ± 22
V49D	100	6,2	97 ± 55
I50D	>10	>60,0	< 10
S51D	100	1,9	316 ± 26
L52D	100	1,7	353 ± 91
E64K	20	≈0,8	NA
N65K	0	> 200,0	< 0,4
L66D	0	> 200,0	< 0,4
L66E	0	> 200,0	< 0,4
I67D	>40	>30,0	< 3
I67E	>75	>10,0	< 8
I68D	20	≈0,8	NA

[0085] TABLA II *Actividades proliferativas de los mutantes de IL-15 en células TF-1β*. NA: No aplicable. Las desviaciones media y típica de las actividades relativas son de 3 experimentos independientes.

5

[0086] Los mutantes del péptido 1 presentaban actividades biológicas que se correlacionaban bien con sus eficacias de unión al IL-15R α medidas en células TF-1: las mutaciones L44D, E46K, L47D y I50D dieron como resultado una fuerte reducción de la actividad biológica de la IL-15, mientras que la mutación Q48K no tenía un efecto significativo, y las mutaciones en las posiciones L45, S51 y L52 indujeron un aumento de 2 a 4 veces de la bioactividad. La única excepción era el mutante V49D que a pesar de una gran disminución de la capacidad de unión, presentaba una bioactividad cercana a la natural. A diferencia de esto, la correlación entre la actividad biológica en las células TF-1 β y la afinidad de unión en las células TF-1 era bastante más débil con mutantes en la región del péptido 2. El mutante N65K que presentaba una afinidad de unión cercana a la natural en las células TF-1 era inactivo en las células TF-1 β . Los mutantes E64K e I68D que también presentaba afinidades de unión cercanas a la natural se comportaban como agonistas parciales en TF-1 β siendo las respuestas máximas aproximadamente 20% de la de la IL-15 natural. La única correlación se encontró para las mutaciones en las posiciones L66 y 167. Los mutantes L66D, L66E, I67D e I67E presentaron bioactividad reducida con un orden clasificado de potencias similar al visto en los ensayos de unión de competición.

20 Discusión

[0087] Al contrario que la cadena IL-2R α que se une a la IL-2 con afinidad baja (35), se ha mostrado que la cadena IL-15R α por sí misma presenta una alta afinidad de unión por la IL-15 (11). Por lo tanto, probablemente la interfase entre la IL-15 y el IL-15R α contribuye a la mayor parte de la energía libre de unión de la IL-15 a su receptor ($\alpha\beta\gamma$) de alta afinidad funcional. Por lo tanto, para diseñar proteínas con propiedades agonistas o antagonistas del sistema de IL-15 es deseable un buen conocimiento de las características moleculares de la interfase de IL-15 /IL-15R α . Hasta ahora no hay datos disponibles sobre el tema y el objetivo principal de este estudio era contribuir a la definición del epítipo en la IL-15 responsable de la unión del IL-15R α .

[0088] Primero se identificaron dos regiones por Pepscan que unían específicamente una forma soluble del IL-15R α . El primero (₄₄LLELQVISL₅₂, péptido 1) está situado en la hélice B, mientras que el segundo (₆₄ENLI₆₈, péptido 2) pertenece a la hélice C.

Los estudios de mutagénesis confirmaron la implicación de estas dos regiones y permitieron a los autores de la invención identificar los aminoácidos que participaban en la unión al receptor e inducción de bioactividad.

La mutación en la posición (150D) redujo mucho la capacidad de la IL-15 para unirse al IL-15R α así como para

inducir la proliferación celular, un resultado que puede reflejar un cambio conformacional local que afecta a la unión y señalización. Sin embargo, este cambio conformacional parece que no altera la estructura global de la molécula.

Se encontró que E46, V49, L45, S51 y L52 estaban implicadas en la unión al IL-15R α .

5

E46 era crucial, puesto que la sustitución de su cadena lateral ácida por una básica (E46K) producía la pérdida completa de la unión de la IL-15 al IL-15R α y la bioactividad.

La sustitución de la cadena lateral hidrófoba de V49 por una cadena lateral con carga negativa (V49D) también produjo una gran reducción (13 veces) de la afinidad de la IL-15 por el IL-15R α . De forma inesperada, el mutante V49D mostró una actividad biológica casi como la natural. Se ha descrito una discrepancia similar entre la afinidad de unión y la bioactividad para un mutante de IL-2 (T51P) (36). Este mutante era tan activo como la IL-2 natural, aunque presentaba una afinidad de unión al receptor 10 veces menor. Se ha mostrado que este mutante era deficiente en la inducción de la internalización de los receptores de alta afinidad, produciendo así una mayor duración de la ocupación del receptor e inducción de respuesta biológica. Debe comprobarse si el análogo de la IL-15 V49D presenta propiedades similares.

Las mutaciones en las posiciones L45, S51 y L52 no produjeron reducción sino un aumento de la unión y la bioactividad, indicando que estos restos también están implicados en la unión al IL-15R α . Los mutantes L44D y L47D mostraron respuestas biológicas alteradas, aunque no se pudo evaluar su afinidad de unión. De forma inesperada, el mutante Q48K mostró propiedades casi como las naturales, aunque Q48 está situado en el centro de un epítipo formado por aminoácidos (L45, E46, V49, S51 y L52) que participan en la unión al receptor. Pueden ser necesarias mutaciones adicionales de este resto para volver a evaluar su potencial implicación en la unión al receptor.

25

[0089] Los resultados de la mutagénesis en la región del péptido 2 mostraron que entre los 5 aminoácidos evaluados (E64 a 168), solo L66 y 167 parecían estar implicados en la unión al receptor. Los mutantes (L66D, L66E, I67D e I67E) presentaron menores afinidades de unión y las correspondientes reducciones de sus actividades biológicas. Los mutantes E64K e I68D tenían afinidades similares a la de la IL-15 natural, sugiriendo que E64 y 168 no están implicados en la unión al IL-15R α . Sin embargo, los mutantes se comportaban como agonistas parciales en el ensayo de proliferación. Puesto que el agonismo parcial es indicativo de la activación defectuosa del receptor (37), E64 y 168 deben estar implicados en el reclutamiento del complejo de transducción IL-2R β/γ . Esta conclusión puede mantenerse para N65 cuya mutación (N65K) produjo una pérdida de la bioactividad sin alteración detectable de la afinidad de unión al IL-15R α . La mutagénesis de la IL-2 de ratón y los estudios de modelado molecular (27, 38) han indicado que además del resto D20 situado en la hélice A (24), la hélice C de la IL-2 humana también está potencialmente implicada en su interacción con el IL-2R β , y un trabajo reciente ha mostrado que una mutación en esta hélice (N88R) producía una pérdida drástica (1000 veces) de la unión de la IL-2 al IL-2R β (26). Los resultados de los autores de la invención sugieren que la correspondiente región en la IL-15 humana, en especial los restos E64, N65 y 168 también participan en el reclutamiento de la cadena IL-2R β .

40

Los mutantes de la IL-15 E64K, N65K e I68D presentan propiedades (sin actividad biológica o baja, a pesar de la alta afinidad de unión al IL-15R α) que los designan como potenciales antagonistas de la IL-15. Los experimentos preliminares indicaban realmente que N65K puede inhibir la proliferación celular inducida por la IL-15.

La región de la IL-15 que corresponde al péptido 2 parece que participa tanto en la unión al IL-15R α como al IL-2R β . La mutagénesis puso de manifiesto que todos los aminoácidos del péptido 2 (E64 a I68) están implicados en este procedimiento.

[0090] La intervención del epítipo correspondiente al péptido 2 tanto en la unión al IL-15R α como en el reclutamiento de IL-2R β puede tener implicaciones en la dinámica del ensamblaje del receptor. Primero la IL-15 se uniría con alta afinidad al IL-15R α conectando los epítopos del péptido 1 y péptido 2 (o parte del mismo). Posteriormente, el reclutamiento de IL-2R β podría implicar la conexión de otra parte del epítipo del péptido 2. Alternativamente, se produciría un cambio conformacional en el que el IL-2R β sustituiría al IL-15R α en la unión al epítipo del péptido 2.

55

En el caso de la IL-2 de ratón, se ha mostrado que una secuencia de la hélice B análoga al epítipo en la IL-15 que corresponde al péptido 1, interacciona con el IL-2R α (en concreto los restos E76, P79, V83 y L86) (27). En el caso de la IL-2 humana, hasta ahora no se han descrito mutaciones en la hélice B que afecten a la unión de la IL-2 al IL-

2R α , aunque el modelado molecular ha predicho un contacto entre la hélice B de la IL-2 humana (en concreto los restos K64 y E68, o E61 y E62) y el IL-2R α (38). A diferencia de esto, la región en la IL-2 dentro de la hélice C análoga al epítipo en la IL-15 que corresponde al péptido 2 no parece que esté implicado en la unión del IL-2R α (27). Por lo tanto, los resultados de los autores de la invención indican que el modo de interacción de la IL-15 con el IL-15R α no es completamente homólogo al modo de interacción de la IL-2 con el IL-2R α . Esto puede reflejar el hecho de que la IL-15 presenta una afinidad por su cadena α que es aproximadamente 500 veces mayor que la afinidad de la IL-2 por su cadena α .

[0091] En conclusión, los autores de la invención identificaron dos regiones en la IL-15 que están implicadas en la unión al IL-15R α , usándose una de ellas también para reclutar la subunidad de transducción IL-2R β . Las muteínas de IL-15 (L45D, L45E, S51D y L52D) que presentan propiedades de unión y biológicas mayores que las de la IL-15 natural y por lo tanto se comportan como superagonistas, son herramientas valiosas para expandir subgrupos de linfocitos (p. ej., linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos T de memoria CD8⁺) y pueden ser útiles como agentes terapéuticos en pacientes con cáncer o inmunodeficiencias. Otras muteínas (E64K, N65K e I68D) presentan propiedades que las designan como potenciales agonistas de la IL-15, y pueden ser útiles en enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide y la reacción de Shwartzman generalizada, en las que se cree que la IL-15 tiene una función importante (22).

EJEMPLO 2:

Procedimientos experimentales:

Mutagénesis dirigida de la IL-15

[0092] La mutagénesis dirigida de la IL-15 se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 1 (kit de mutagénesis dirigida QuikChange).

[0093] *Purificación de la proteína FLAG-IL-15:* La proteína FLAG-IL-15 mutante se purificó por afinidad. 100 ml de líquido sobrenadante recogido de los cultivos de células 293-EBNA 48 h después de la transfección, se hicieron precipitar con sulfato amónico en concentración saturada al 70%. Las células 293-EBNA tienen la denominación 293 c-18 y están disponibles en el ATCC con el número de acceso CRL-10852 (American Type Culture Collection ATCC; P.O. Box 1549; Manassas, VA 20108; EE.UU.). El sedimento se disolvió en TBS (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) y se dializó contra TBS en tubos Spectra/Por con corte de exclusión de 6-8000 Daltons. El dializado se purificó por lotes sobre 100 ml de gel de afinidad M2 dirigido contra Flag (Sigma-Aldrich). La proteína FLAG-IL-15 mutante se eluyó del gel con 800 μ l de glicina 100 mM pH 3,5 y se neutralizó con Tris 1 M pH 8. La proteína purificada se dializó contra RPMI y se esterilizó por filtración antes de ensayar en un ensayo de proliferación.

[0094] *Ensayos de proliferación.* La actividad inhibidora de la FLAG-IL-15 mutante se evaluó por incorporación de [³H]-timidina en células TF-1 β (obtenidas como se ha descrito antes en el ejemplo 1 anterior) en presencia de mAb A41 dirigido contra IL-2R β 66 nM [disponible en Roche Diagnostic GmbH (Penzberg, Alemania); para en estos experimentos se puede usar alternativamente cualquier anticuerpo dirigido contra IL-2R β que presente una actividad inhibidora en las bioactividades mediadas por el IL-2R β , tal como, p. ej., el anticuerpo policlonal AF-224-NA (R&S Systems Inc., Minneapolis, EE.UU.).

Las células se mantuvieron en medio de cultivo durante 3 días, se lavaron dos veces, y se dejaron sin nutrientes durante 2 h en el mismo medio sin citoquina. Se cultivaron en placa 10⁴ células en 100 μ l y se cultivaron durante 48 h en el medio complementado con mAb A41 66 nM, concentración fija de rIL-15 10 pM y concentración creciente de FLAG-IL-15 mutante. Las células se pulsaron durante 16 h con [³H]-timidina 0,5 μ Ci/pocillo y se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se midió la radiactividad asociada a la célula.

Resultados:

[0095] *Mutagénesis dirigida de IL-15.* Se generaron mutantes en las posiciones 64-68 (péptido 2) y 64-49 (péptido 2a), y se expresaron como proteínas de fusión con un péptido FLAG N-terminal en células 293-EBNA.

Se ensayó en las FLAG-IL-15 mutantes la capacidad para unirse al IL-15R α expresado por células TF-1, en un ensayo de competición que permite a los autores de la invención comparar las eficacias de los diferentes mutantes

para inhibir la unión de una concentración baja, no saturante, de rIL-15 radioyodado a células TF-1. Las curvas de competición se muestran en la figura 6, y las concentraciones de mutantes que dan efectos de 50% de inhibición máxima (valores de CI50) se listan en la Tabla III.

5 Tabla III. Propiedades de unión de las IL-15 mutantes en la línea celular TF-1.

Proteínas FLAG-IL-15	CI50 (pM)	Actividad relativa(% del natural)
Natural	23,6	100
E46K	NA	NA
L69R	9,1	259
Natural, tipo natural.		
NA, no aplicable		

[0096] FLAG-IL-15 inhibía la unión de la rIL-15 marcada con una CI50 de 23,6 pM. La mutación en la posición Leu-69 dio como resultado una afinidad ligeramente mayor de la IL-15 (CI50 = 9,1 nM) en este ensayo de competición.

10

Después se ensayaron los efectos de promoción del crecimiento de los mutantes en las células TF-1 β sensibles a la IL-15 (Fig. 7). El mutante L69R se comportaba como un agonista parcial en TF-1 β siendo la respuesta máxima aproximadamente 2% de la de la IL-15 natural.

15 **[0097]** *Inhibición por Flag-IL15N65K de la proliferación de TF1 β inducida por la IL-15 en presencia de A41.* La expresión de las 3 cadenas de receptor IL-15R α , IL-2R β y γ_c en la membrana celular permite obtener una respuesta de alta afinidad a la IL-15. La expresión de ambas cadenas de receptor IL-2R β y γ_c permite obtener una respuesta proliferativa de afinidad intermedia a la IL-15. Se usó un mAB dirigido contra IL-2R β , A41, que bloquea específicamente el receptor IL-2R β / γ_c para bloquear la proliferación inducida por la IL-15 por el receptor de afinidad intermedia. El mutante N65K de FLAG-IL-15 purificado por afinidad produjo una inhibición completa de la proliferación inducida por la IL-15 con una CI50 de 12 pM (Fig. 8), en correlación con su capacidad de unión al IL-15R α en células TF-1 (CI50 = 26,6 pM). La proliferación celular se inhibió totalmente con 100 pM.

20

Discusión:

25

[0098] Los resultados de la mutagénesis en la región del péptido 2/2a mostraron que entre los 6 aminoácidos evaluados (Glu-64 a Leu-69), los mutantes E64K, I68D y L69R tenían afinidades de unión al IL-15R α al menos similares a las de la IL-15 natural. Sin embargo, los mutantes se comportaban como agonistas parciales en el ensayo de proliferación. Debido a que el agonismo parcial es indicativo de la activación defectuosa del receptor, Glu-64, Ile-68 y L69R pueden estar implicados en el reclutamiento del complejo de transducción IL-2R β / γ_c .

30

Esta conclusión se puede mantener para Asn-65 cuya mutación (N65K) producía una pérdida de bioactividad sin alteración detectable de la afinidad de unión al IL-15R α .

35 Nuestros resultados sugieren que las regiones en la hélice C de la IL-15 humana, en especial los restos Glu-64, Asn-65, Ile-68 y L69R, participan en el reclutamiento de la cadena del IL-2R β .

[0099] Los mutantes de IL-15 E64K, N65K, I68D y L69R presentan propiedades (sin actividad biológica o baja, a pesar de la alta afinidad de unión al IL-15R α) que los designan como antagonistas de la IL-15 (N65K) o agonistas parciales (E64K, I68D, L69R). Los resultados mostrados en la figura 8 indican que N65K puede inhibir totalmente la proliferación celular inducida por la IL-15 de alta afinidad.

40

Notas

45 **[0100]** Las abreviaturas usadas son: IL, interleuquina; rIL, IL recombinante; IL-15R α , cadena α del receptor de la IL-15; NK, citolítico natural; Jak, Janus quinasa; Stat, transductor de señal y activador de la transcripción; Lck, tirosina quinasa específica de linfocitos; syk, tirosina quinasa de bazo; MAP, proteína quinasa activada por mitógeno; Bcl, leucemia de linfocitos B; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, mAb, anticuerpo monoclonal; ELISA, enzimoimmunoanálisis de adsorción; RIA, radioinmunoensayo PCR, reacción en cadena de la polimerasa; Dhfr, dihidrofolato reductasa; CI50, concentración inhibitoria de 50%; CE50, concentración eficaz de 50%; SP, péptido señal; PPL, preprolactina.

50

Referencias**[0101]**

1. Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J.,
5 Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M., y Giri, J. G. (1994) *Science* 264, 965-968
2. Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., y
10 Waldmann, T. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4935-4939
3. Sprang, S. R., y Bazan, J. F. (1993) *Cur. Op. Struct. Biol.* 3, 815-827
4. Carson, W. E., Giri, J. G., Lindeman, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J.,
15 Grabstein, K., y Caligiuri, M. A. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 1395-1403
5. Armitage, R. J., Macduff, B. M., J., E., Paxton, R., y Grabstein, K. H. (1995) *J. Immunol.* 154, 483-490
6. Wilkinson, P. C., y Liew, F. Y. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 1255-1259
- 20 7. Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K. H., Kumaki, A., Namen, A., Park, L. S.,
Cosman, D., y Anerson, D. M. (1994) *EMBO J.* 13, 2822-2830
8. Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert,
25 D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Shapiro, D. N., Morris, S. W., Park, L. S., y Cosman, D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270,
29862-29869
9. Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B., y Campbell, I. D. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 717-725
10. Minami, Y., Kono, T., Miyasaki, T., y Taniguchi, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245-267
- 30 11. Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., y Cosman, D. (1995) *J. Leukoc. Biol.* 5745,
763-766
12. Lehours, P., Raheer, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A., y Jacques, Y. (2000) *Eur. Cytokine Netw.* 11, 207-215
- 35 13. Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., Gupta, S.,
Chen, Y. Q., Giri, J. D., y O'Shea, J. J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8705-8709
14. Miyasaki, T., Liu, Z.-J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E. L., Perlmutter, R
40 M., y Taniguchi, T. (1995) *Cell* 81, 223-231
15. Bulanova, E., Budagian, V., Pohl, T., Krause, H., Durkop, H., Paus, R, y Bulfone-Paus, S. (2001) *J. Immunol.*
167, 6292-6302
- 45 16. Pereno, R., Giron-Michel, J., Gaggero, A., Cazes, E., Meazza, R, Monetti, M., Monaco, E., Mishal, Z., Jasmin, C.,
Indiveri, F., Ferrini, S., y Azzarone, B. (2000) *Oncogene* 19, 5153-5162
17. Bulfone-Paus, S. S., Bulanova, E., Pohl, T., Budagian, V., Durkop, H., Ruckert, R., Kunzendorf, U., Paus, R., y
50 Krause, H. (1999) *Faseb J.* 13, 1575-1585
18. Stevens, A. C., Matthews, J., Andres, P., Baffis, V., Zheng, X. X., Chae, D. W., Smith, J., Strom, T. B., y
Maslinski, W. (1997) *Am. J. Physiol.* 272, G1201-1208
19. Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K.,
55 Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., y Peschon, J. J. (2000) *J.*
Exp. Med. 191, 771-780
20. Lodolce, J. P., Burkett, P. R, Boone, D. L., Chien, M., y Ma, A. (2001) *J. Exp. Med.* 194, 1187-1194

21. Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., y Strom, T. B. (2001) *Nat. Med.* 7, 114-118
22. Fehniger, T. A., y Caligiuri, M. A. (2001) *Blood* 97, 14-32
- 5 23. Fehniger, T. A., Cooper, M. A., y Caligiuri, M. A. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 169-183
24. Collins, L., Tsien, W. H., Seals, C., Hakimi, J., Weber, D., Bailon, P., Hoskings, J., Greene, W. C., Toome, V., y Ju, G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7709-7713
- 10 25. Sauve, K., Nachman, M., Spence, C., Bailon, P., Campbell, E., Tsien, W. H., Kondas, J. A., Hakimi, J., y Ju, G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4636-4640
26. Shanafelt, A. B., Lin, Y., Shanafelt, M. C., Forte, C. P., Dubois-Stringfellow, N., Carter, C., Gibbons, J. A., Cheng, S. L., Delaria, K. A., Fleischer, R., Greve, J. M., Gundel, R., Harris, K., Kelly, R., Koh, B., Li, Y., Lantz, L., Mak, P., Neyer, L., Plym, M. J., Rocznik, S., Serban, D., Thrift, J., Tsuchiyama, L., Wetzell, M., Wong, M., y Zolotarev, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18, 1197-1202
- 15 27. Zurawski, S. M., Vega, F. J., Doyle, E. L., Huyghe, B., Flaherty, K., McKay, D. B., y Zurawski, G. (1993) *EMBO J.* 12, 5113-5119
- 20 28. Pettit, D. K., Bonnert, T. P., Eisenman, J., Srinivasan, S., Paxton, R., Beers, C., Lynch, D., Miller, B., Yost, J., Grabstein, K. H., y Gombotz, W. R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2312-2318
- 25 29. Farner, N. L., Gan, J., de Jong, J. L., Leary, T. P., Fenske, T. S., Buckley, P., Dunlap, S., y Sondel, P. M. (1997) *Cytokine* 9, 316-327
30. Weiss, A., Wiskocil, R.L., y Stobo, J.D. (1984) *J. Immunol.* 133, 123-128.
- 30 31. Matrisian, L. N., Bowden, G. T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J. P., Leroy, P., y Breathnach, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9413-9417
32. Blanc, C., Vusio, P., Schleinkofer, K., Boisteau, O., Pflanz, S., Minvielle, S., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., Jacques, Y., y Montero-Julian, F. A. (2000) *J. Immunol. Methods* 241, 43-59
- 35 33. Sloatstra, J. W., Puijk, W. C., Ligtvoet, G. J., Langeveld, J. P., y Meloen, R. H. (1996) *Mol. Divers.* 1, 87-96
34. Tejedor, F., y Ballesta, J. P. G. (1982) *Anal. Biochem.* 127, 143-149
- 40 35. Greene, W. C., Robb, R. J., Svetlick, P. B., Rusk, C. M., Depper, J. M., y Leonard, W. J. (1985) *J. Exp. Med.* 162, 363-368
36. Chang, D. Z., Wu, Z., y Ciardelli, T. L. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 13349-13355.
- 45 37. Black, J. (1989) *Science* 139, 1550-1556
38. Bamborough, P., Hedgecock, C. J., y Richards, W. G. (1994) *Structure* 2, 839-851

REIVINDICACIONES

1. Muteína de IL-15 **caracterizada porque** tiene una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por al menos una sustitución, eliminación o adición en la región que se extiende del resto 44 al resto 52, correspondiendo esta numeración de restos a la IL-15 natural madura humana, con la condición de que la muteína de IL-15 resultante de eso tenga una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no sea significativamente diferente o sea mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y **caracterizada porque** es un agonista de la IL-15, en la que dicha al menos una sustitución, eliminación o adición comprende la sustitución de al menos uno de los restos 45, 51, 52 por un aminoácido seleccionado de D, E, K, R.
- 10 2. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 45 por D, E, K o R.
- 15 3. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32.
4. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 51 por D, E, K o R.
- 20 5. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36.
6. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 52 por D, E, K o R.
- 25 7. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 1 ó 6, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40.
8. Muteína de IL-15 **caracterizada porque** tiene una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por al menos una sustitución, eliminación o adición en la región que se extiende del resto 64 al resto 69, correspondiendo esta numeración de restos a la IL-15 natural madura humana, con la condición de que la muteína de IL-15 resultante de eso tenga una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no sea significativamente diferente o sea mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y **caracterizada porque** es un antagonista de la IL-15, en la que dicha al menos una sustitución, eliminación o adición comprende la sustitución de al menos uno de los restos 64, 65, 68, 69 por un aminoácido que se selecciona:
- 30 - de K, R para el resto 64,
- 35 - de D, E, K, R para los restos 65, 68, 69.
- 40 9. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 64 por K o R.
10. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.
- 45 11. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 64 por K, D, E o R.
- 50 12. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8 u 11, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 46.
13. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** dicha al menos una sustitución es una sustitución del resto 68 por K, D, E o R.
- 55 14. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50.
15. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada porque** dicha al menos una

sustitución es una sustitución del resto 69 por R, D, E o K.

16. Muteína de IL-15 de acuerdo con la reivindicación 8 ó 15, **caracterizada porque** tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 85 o SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 84.
- 5 17. Fragmento del agonista de la IL-15 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que todavía comprende la región 44-52 mutada, y que todavía tiene una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no es significativamente diferente o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, que todavía es un agonista de la IL-15.
- 10 18. Fragmento de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-18.
- 15 19. Fragmento del antagonista de la IL-15 de una cualquiera de las reivindicaciones 8-16, que todavía comprende la región 64-69 mutada, y que todavía tiene una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no es significativamente diferente o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y que todavía es un antagonista de la IL-15.
- 20 20. Fragmento de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado porque** comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 19-28.
21. Fragmento de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado porque** comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 77-80.
- 25 22. Ácido nucleico que codifica una muteína de IL-15 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, o un fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-21.
23. Vector que contiene al menos un ácido nucleico de la reivindicación 22.
- 30 24. Célula transfectada o transformada por un vector de acuerdo con la reivindicación 23.
25. Fármaco que comprende una muteína de IL-15 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y/o un fragmento de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, y que comprende opcionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 35 26. Uso de una muteína de IL-15 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o de un fragmento de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, para fabricar un fármaco anticancerígeno o antiinmunodeficiencia.
- 40 27. Fármaco que comprende una muteína de IL-15 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-16, y/o un fragmento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 19-21, y que comprende opcionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 45 28. Uso de una muteína de IL-15 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-16, o un fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, para fabricar un fármaco antiinflamatorio.
29. Procedimiento para cribar un agonista o antagonista de la IL-15, **caracterizado porque** comprende:
- i. proporcionar una pluralidad de:
- 50 - muteínas de IL-15, que tienen una secuencia que se puede obtener de la IL-15 natural madura humana por al menos una sustitución, eliminación o adición en la región que se extiende del resto 44 al resto 52, y/o del resto 64 al resto 68, y/o del resto 64 al resto 69, correspondiendo esta numeración de restos a la IL-15 natural madura humana, con la condición de que la muteína de IL-15 resultante de eso tenga una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que no sea significativamente diferente o sea mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa, y/o de
- 55 - fragmentos de dichas muteínas de IL-15, que todavía comprenden la región 44-52 mutada, y/o la región 64-68 mutada, y/o la región 64-69 mutada, y que todavía tienen una afinidad por la unión al IL-15Ralfa que

no es significativamente diferente o es mayor que la afinidad de la IL-15 natural madura humana por la unión al IL-15Ralfa,

ii. comparar sus afinidades de unión respectivas por el IL-15Ralfa con la afinidad de unión de la IL-15 natural madura,

iii. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos de muteínas que tienen una afinidad de unión que no es significativamente diferente o que es mayor que la de la IL-15 natural madura.

10 30. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, que es para cribar un agonista de la IL-15, **caracterizado porque** comprende además:

iv. seleccionar al menos una actividad detectable inducible por la IL-15,

15 v. comparar el nivel de dicha actividad que es inducida en respuesta a las muteínas o fragmentos seleccionados en la etapa iii., con el inducido por la IL-15 natural madura,

vi. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos que inducen un nivel de actividad que no es significativamente diferente o que es mayor que el de la IL-15 natural madura.

20 31. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, que es para cribar un antagonista de la IL-15, **caracterizado porque** comprende además:

iv. seleccionar al menos una actividad detectable inducible por la IL-15,

25 v. comparar el nivel de dicha actividad que es inducida en respuesta a las muteínas o fragmentos seleccionados en la etapa iii., con el inducido por la IL-15 natural madura,

vi. seleccionar aquellas muteínas o fragmentos que inducen un nivel de actividad que es menor que el de la IL-15 natural madura o que no inducen un nivel de actividad detectable.

```

1 gactccgggt ggcagggcc cgggggaatc ccagctgact cgctcactgc cttcgaagtc
61 cggcgcccc cgggagggaa ctgggtggcc gcacctccc ggctgcggtg gctgtcgccc
121 ccaccctgc agccaggact cgatggagaa tccattccaa tatatggcca tgtggctctt
181 tggagcaatg ttccatcatg ttccatgctg ctgctgacgt cacatggagc acagaaatca
241 atgttagcag atagccagcc catacaagat cgtattgtat tgtaggaggc atcgtggatg
301 gatggctgct ggaaccctt tgccatagcc agctcttctt caatacttaa ggatttaccg
361 tggcctttgag taatgagaat ttcgaaacca catttgagaa gtatttccat ccagtgctac
421 ttgtgtttac ttctaaacag tcattttcta actgaagctg gcattcatgt cttcattttg
481 ggctgtttca gtgcagggct tctaaaaaca gaagccaact gggtgaatgt aataagtgat
541 ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct atgcataatg atgctacttt atatacggaa
601 agtgatgttc accccagttg caaagtaaca gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa
661 gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt attcatgata cagtagaaaa tctgatcctc
721 ctagcaaaaa acagtttctc ttctaattgg aatctggagc aatctggagc caaagaatgt
781 gaggaactgg aggaaaaaaa tattaaagaa tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa
841 atgttcatca acacttcttg attgcaatg attcttttla aagtgtttct gttattaaca
901 aacatcactc tgctgcttag acatacaaaa acactcggca tttcaaatgt gctgtcaaaa
961 caagtttttc tgtcaagaag atgacagac cttggatcag atgaactctt agaaatgaag
1021 gcagaaaaat gtcattgagt aatatagtg aatatagtgga ctatgaactt ctctcagact tactttactc
1081 atttttttaa tttattattg aaattgtaca tatttgggga ataattgaaa atgttgaata
1141 aaaatatgta caagtgtgt tttttaagtt gcactgatat ttacctctt attgcaaaaat
1201 agcattttgt taaggtgat agtcaaatg aagtcaaatg gggctgggta ccaatgctgc
1261 aggtcaacag ctatgctggt aggtcctgc agtggtggaa ccaactgacta ctggctctca
1321 ttgacttctt tactaagcat agcaaacaga ggaagaattt gttatcagta agaaaaagaa
1381 gaactatatg tgaatcctct tctttatact gtaatttagt tattgatgta taaagcaact
1441 gttatgaaat aaagaaattg caataactgg caaaaaaaaa aaaaaaaa

```

SEQ ID NO : 1 IL-15 madura natural IL-15 humana (CDS de 373 a 861)

FIGURA 1A

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM ⁴⁴KCFLLELQVI ⁵²SLESGDASIH
61 ⁶⁴DTVENLILA ⁶⁹NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

SEQ ID NO :2

IL-15 madura natural humana

FIGURA 1A (final)

	646	672	
	ctc ttg gag tta caa gtt att tca ctt		<u>SEQ ID NO:3</u>
péptido 1:	45	51 52	
	L L E L Q V I S L		<u>SEQ ID NO:4</u>
	706	720	
	gaa aat ctg atc atc		<u>SEQ ID NO:5</u>
péptido 2:	64 65	68	
	E N L I I		<u>SEQ ID NO:6</u>
	706	723	
	gaa aat ctg atc atc cta		<u>SEQ ID NO:66</u>
péptido 2a:	64 65	69	
	E N L I I L		<u>SEQ ID NO:67</u>

FIGURA 1B

péptido 1: 45 51 52
 L L E L Q V I S L SEQ ID NO :4

----- péptidos mutantes -----

L D E L Q V I S L	<u>SEQ ID NO :7</u>
L E E L Q V I S L	<u>SEQ ID NO :8</u>
L K E L Q V I S L	<u>SEQ ID NO :9</u>
L R E L Q V I S L	<u>SEQ ID NO :10</u>
L L E L Q V I D L	<u>SEQ ID NO :11</u>
L L E L Q V I E L	<u>SEQ ID NO :12</u>
L L E L Q V I K L	<u>SEQ ID NO :13</u>
L L E L Q V I R L	<u>SEQ ID NO :14</u>
L L E L Q V I S D	<u>SEQ ID NO :15</u>
L L E L Q V I S E	<u>SEQ ID NO :16</u>
L L E L Q V I S K	<u>SEQ ID NO :17</u>
L L E L Q V I S R	<u>SEQ ID NO :18</u>

FIGURA 2A

péptido 2:	64 65 68 E N L I I	<u>SEQ ID NO :6</u>
<hr/>		
	péptidos mutantes	
	K N L I I	<u>SEQ ID NO :19</u>
	R N L I I	<u>SEQ ID NO :20</u>
	E D L I I	<u>SEQ ID NO :21</u>
	E E L I I	<u>SEQ ID NO :22</u>
	E K L I I	<u>SEQ ID NO :23</u>
	E R L I I	<u>SEQ ID NO :24</u>
	E N L I D	<u>SEQ ID NO :25</u>
	E N L I E	<u>SEQ ID NO :26</u>
	E N L I K	<u>SEQ ID NO :27</u>
	E N L I R	<u>SEQ ID NO :28</u>

FIGURA 2B

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLEELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L45D SEQ ID NO :29

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLEELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L45E SEQ ID NO :30

FIGURA 2C

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLKELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L45K SEQ ID NO :31

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLRELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L45R SEQ ID NO :32

FIGURA 2C (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI DLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

S51D SEQ ID NO :33

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI ELESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

S51E SEQ ID NO :34

FIGURA 2C (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI KLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

S51K SEQ ID NO :35

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI RLESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

S51R SEQ ID NO :36

FIGURA 2C (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
 31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SDESGDASIH
 61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
 91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L52D SEQ ID NO :37

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
 31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SEESGDASIH
 61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
 91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L52E SEQ ID NO :38

FIGURA 2C (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SKESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TEGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L52K SEQ ID NO :39

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SRESGDASIH
61 DTVENLIILA NNSLSSNGNV TEGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L52R SEQ ID NO :40

FIGURA 2C (final)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVKNLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

E64K SEQ ID NO :41

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVRNLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

E64R SEQ ID NO :42

FIGURA 2D

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVEDLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

N65D SEQ ID NO :43

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVEELIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

N65E SEQ ID NO :44

FIGURA 2D (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVEKLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

N65K SEQ ID NO :45

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVERLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

N65R SEQ ID NO :46

FIGURA 2D (continuación)

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIDLA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

I68D SEQ ID NO :47

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIELA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

I68E SEQ ID NO :48

FIGURA 2D (continuación)

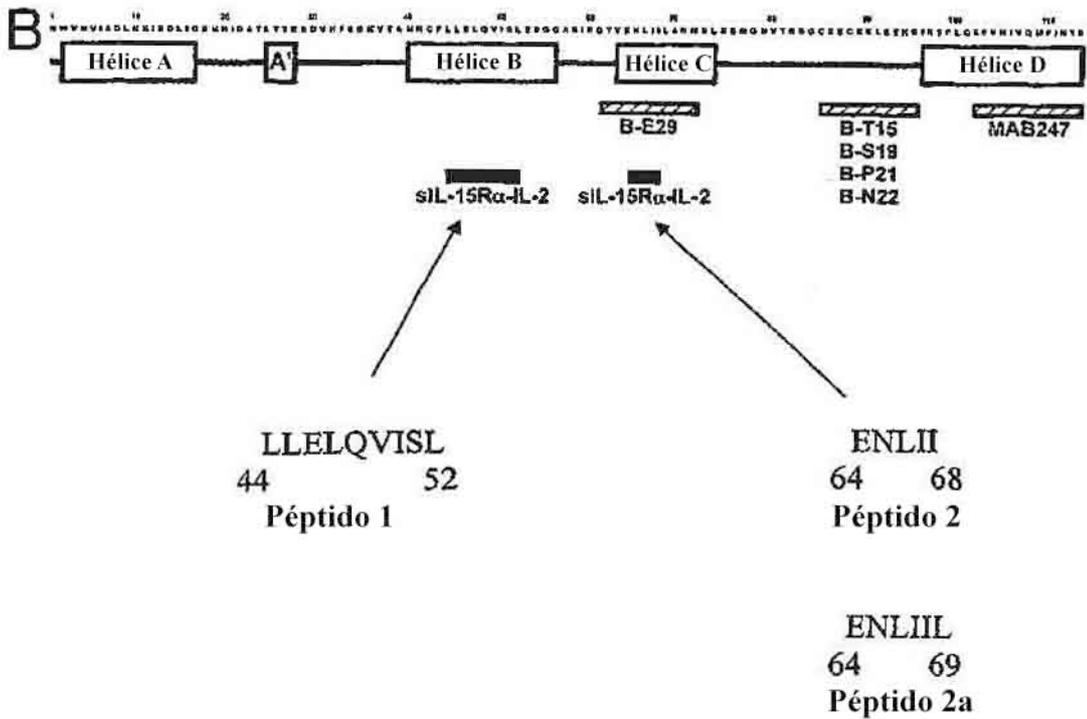
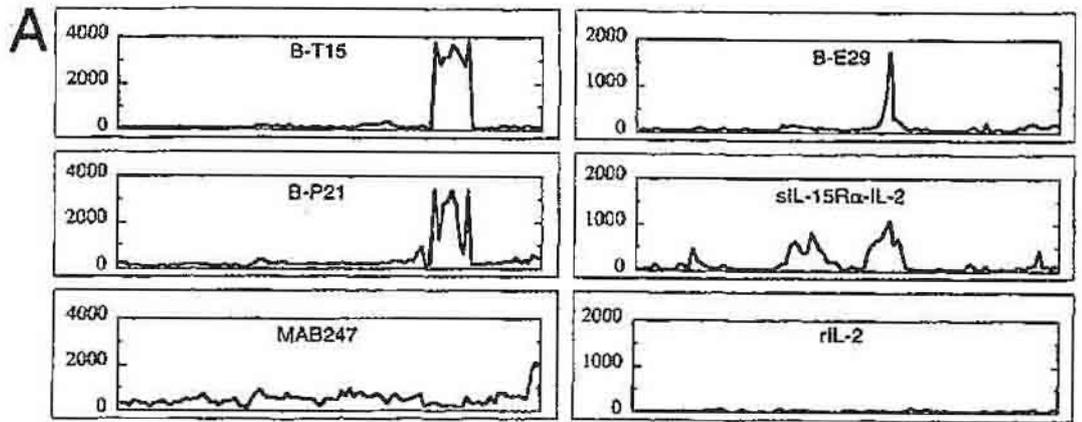
1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIKLA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

I68K SEQ ID NO :49

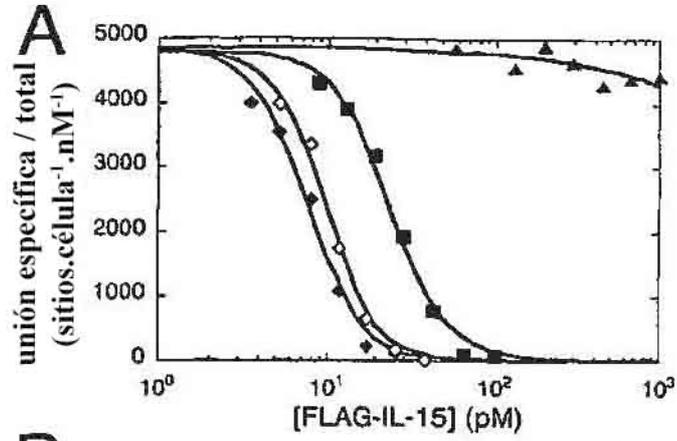
1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIRLA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

I68R SEQ ID NO :50

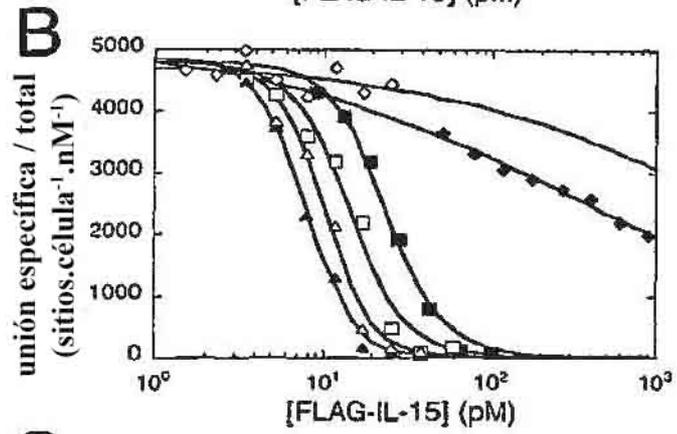
FIGURA 2D (final)



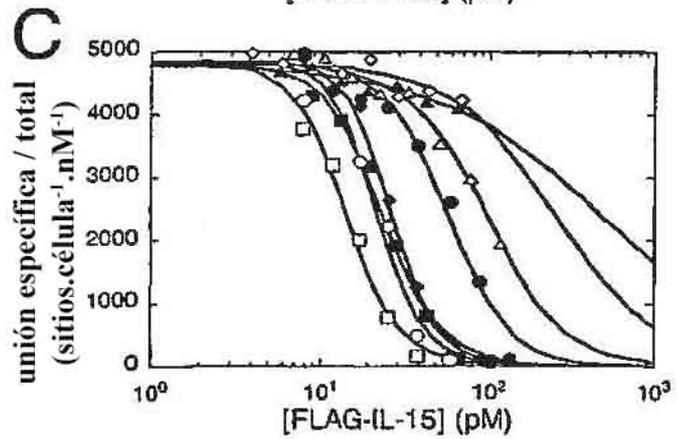
FIGURAS 3A y 3B



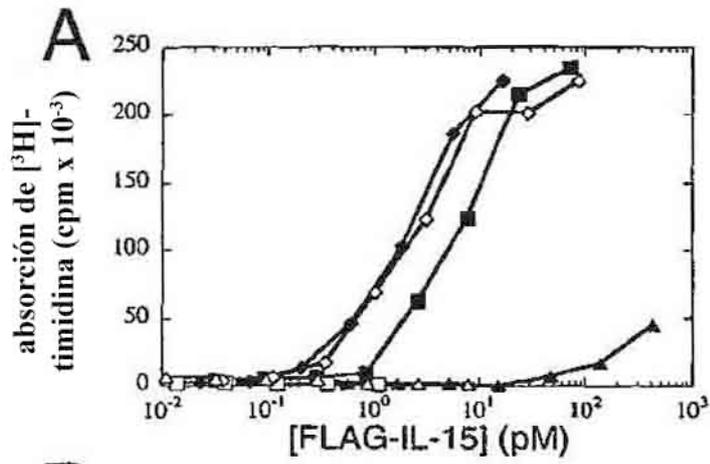
FIGURAS 4A



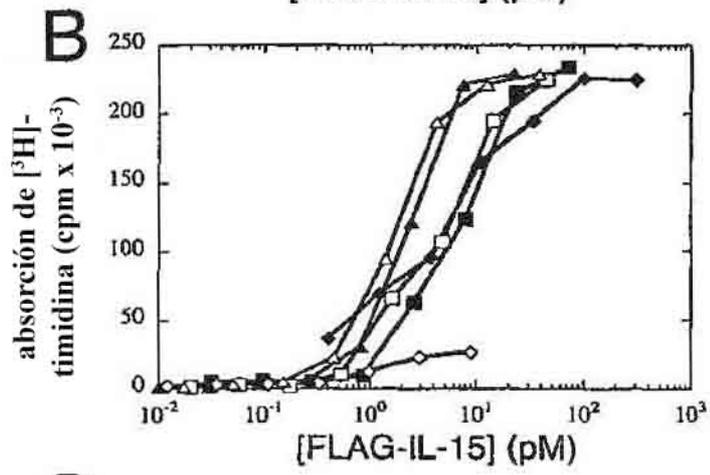
FIGURAS 4B



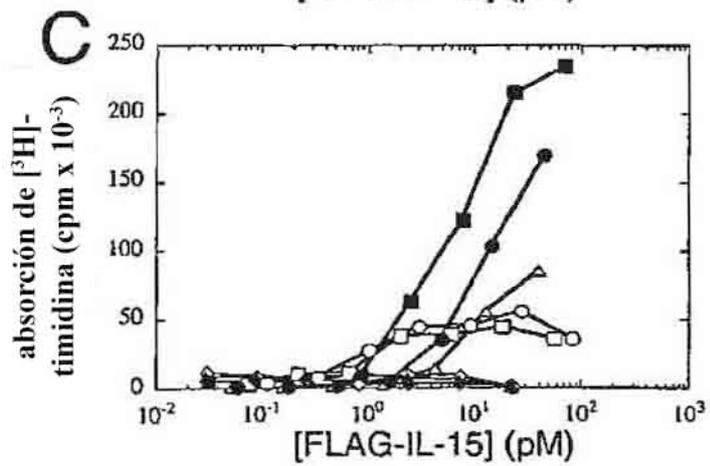
FIGURAS 4C



FIGURAS 5A



FIGURAS 5B



FIGURAS 5C

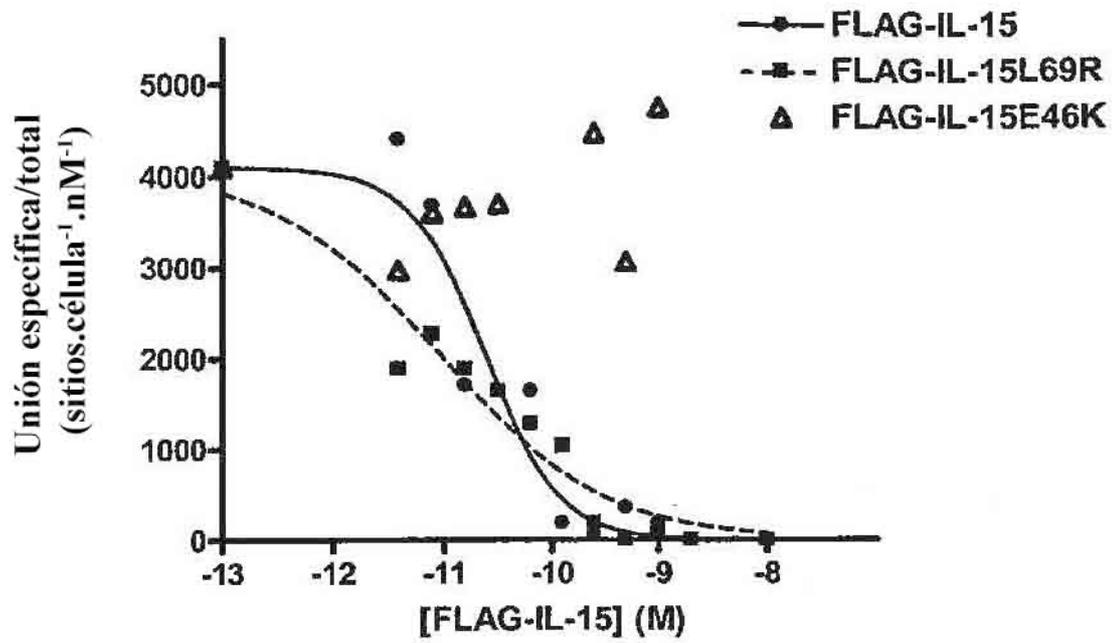


FIGURA 6

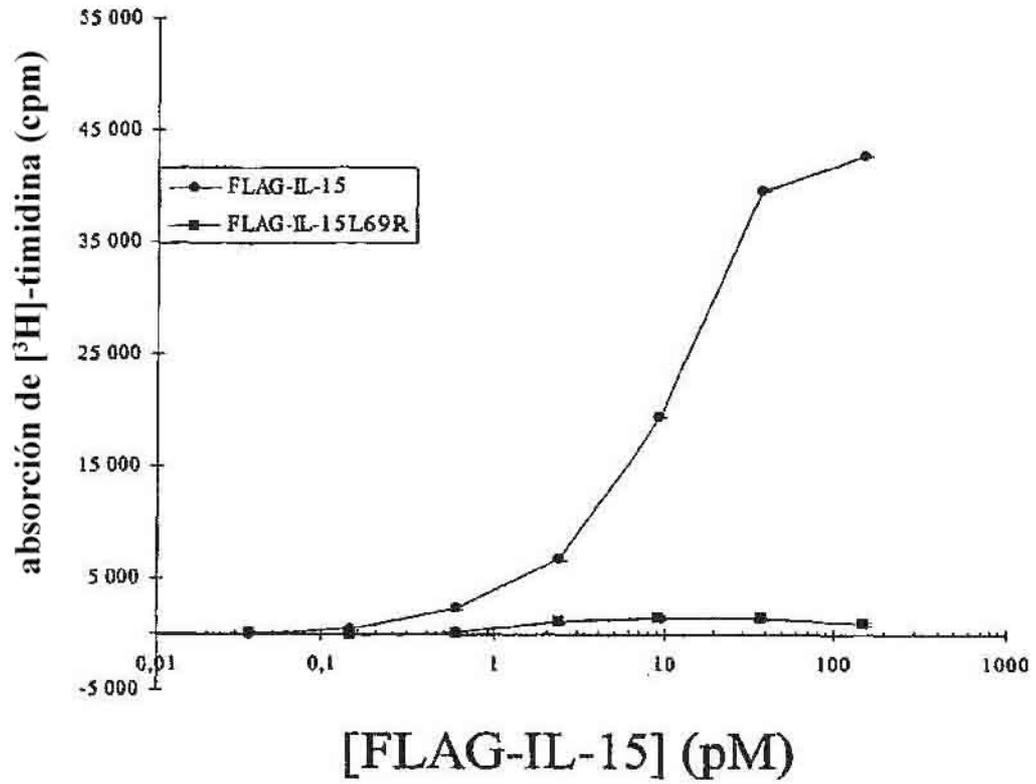


FIGURA 7

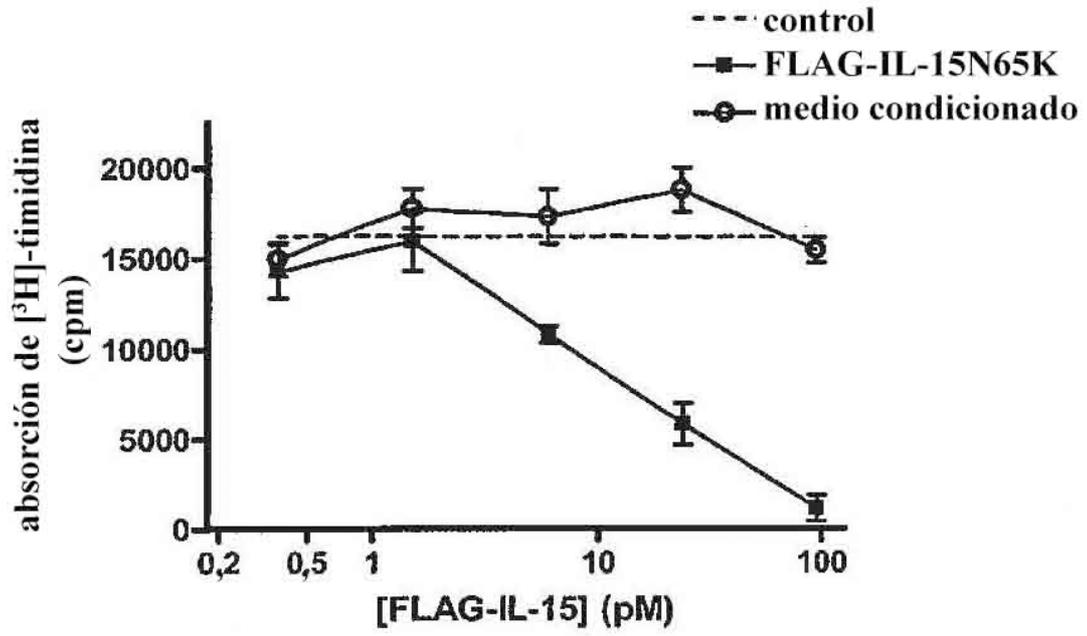


FIGURA 8

péptido 2:	64 65 68 69 E N L I I L	<u>SEQ ID NO : 67</u>
----- péptidos mutantes -----		
	K N L I I L	<u>SEQ ID NO : 68</u>
	R N L I I L	<u>SEQ ID NO : 69</u>
	E D L I I L	<u>SEQ ID NO : 70</u>
	E E L I I L	<u>SEQ ID NO : 71</u>
	E K L I I L	<u>SEQ ID NO : 72</u>
	E R L I I L	<u>SEQ ID NO : 73</u>
	E N L I D L	<u>SEQ ID NO : 74</u>
	E N L I E L	<u>SEQ ID NO : 75</u>
	E N L I K L	<u>SEQ ID NO : 76</u>
	E N L I I D	<u>SEQ ID NO : 77</u>
	E N L I I E	<u>SEQ ID NO : 78</u>
	E N L I I K	<u>SEQ ID NO : 79</u>
	E N L I I R	<u>SEQ ID NO : 80</u>
	E N L I R L	<u>SEQ ID NO : 81</u>

FIGURA 9

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIIDA NNSLSSNGNV TESGCKECE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L69D SEQ ID NO :82

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIIEA NNSLSSNGNV TESGCKECE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L69E SEQ ID NO :83

FIGURA 10

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIIKA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L69K SEQ ID NO :84

1 NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD
31 VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
61 DTVENLIIRA NNSLSSNGNV TESGCKECEE
91 LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

L69R SEQ ID NO :85

FIGURA 10 (final)