

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 016**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54	(2006.01)	A61K 38/00	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)		
C07K 14/775	(2006.01)		
C07K 19/00	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/62	(2006.01)		
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10814739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2511294**

54 Título: **Conjugados y composiciones para inmunoterapia y tratamiento anti-tumoral**

30 Prioridad:

11.12.2009 ES 200931158
27.05.2010 ES 201030813

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

27.05.2014

73 Titular/es:

PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. (50.0%)
Avda. Pío XII, 22 Oficina 1
31008 Pamplona - Navarra, ES y
RESEARCH CENTER BORSTEL (50.0%)

72 Inventor/es:

BERRAONDO LÓPEZ, PEDRO;
FIORAVANTI, JESSICA;
MEDINA ECHEVERZ, JOSÉ;
MELERO BERMEJO, IGNACIO JAVIER;
OCHOA NIETO, MARIA DEL CARMEN;
PALAZÓN GARCIA, FRANCISCO DE ASIS;
BULFONE-PAUS, SILVIA y
DUITMAN, ERWIN HANS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 463 016 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).

DESCRIPCION**CONJUGADOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA Y TRATAMIENTO ANTI-TUMORAL****5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

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

Otra posibilidad de aumentar la actividad de IL15 consiste en su co-administración con una proteína de fusión que comprende la región constante de una inmunoglobulina y la región soluble de la cadena α del receptor de IL15, lo

que resulta en un aumento de 50 veces en la actividad de IL15 (Rubinstein M.P. et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9166–71 y Stoklasek T.A. et al., 2006, J. Immunol.; 177:6072–80).

5 Recientemente se ha demostrado que un polipéptido formado por los aminoácidos 1 al 77 del extremo amino terminal de la cadena α del receptor de IL15 (el llamado “dominio sushi”) es un agonista de la IL15 [Mortier, E., et al., J Biol Chem, 2006. 281(3): p. 1612-9]. Así, la administración de una proteína de fusión que contiene dicho dominio e IL15 muestra un efecto antitumoral superior al de IL15 y que resulta en la disminución del 65% en el número de metástasis en pulmón del tumor B16F10 y en la disminución del número de metástasis de tumor HCT-116 humano implantado en el intestino ciego de ratones nude [Bessard, A., et al., Mol Cancer Ther, 2009. 8(9): p. 10 2736-45].

Otra alternativa para conseguir mejorar el efecto de IL15 sin incurrir en efectos secundarios indeseados consiste en modificar la molécula con el fin de aumentar su vida media. Así, US2006257361 describe proteínas de fusión que comprenden la región constante de una inmunoglobulina e IL15 que presentan vidas medias en suero tras su 15 administración superiores a IL15 no modificada.

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

20

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cinética de la expresión de hIL15 (ng/mL) en el tiempo t (h: horas). Grupos de Ratones C57B16 recibieron una inyección hidrodinámica con los plásmidos, pApo-hIL15 + pSushi, pApo-hIL15, pHIL15 + pSushi, pHIL15, pApo o solución salina (S). A las 8, 24, 96, 168 y 240 horas se extrajo sangre y se analizó mediante ELISA la concentración sérica de hIL15. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2-3 animales por grupo. Los resultados se compararon estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas, seguido de un test de Bonferroni. Se observan diferencias significativas entre los niveles de hIL15 a las 8 y 24h del grupo tratados con pApo-hIL15 con respecto al resto de los grupos ($p < 0,001$).

Figura 2. Ensayo funcional de proliferación de pApo-hIL15 coadministrado con pSushi mediante inyección hidrodinámica. Se cultivaron células CTLL2 con diluciones seriadas de sueros obtenidos a las 24h de tratar ratones con pApo-hIL15 y pApo-hIL15 + pSushi. A las 48h se estudió la incorporación de timidina tritiada a células CTLL2 como índice de proliferación (c.p.m.) y se observó que los sueros de los ratones tratados simultáneamente con

pApo-hIL15 y pSushi inducían una mayor proliferación que los sueros de ratones tratados únicamente con pApo-hIL15 ($p < 0,001$). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 4-5 animales por grupo. Los resultados se compararon estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas.

5 **Figura 3.** Aumento del número total y porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los esplenocitos totales en el tiempo (t (d), en días). Grupos de ratones C57B16 recibieron mediante inyección hidrodinámica las distintas construcciones plasmídicas y a los 3, 4, 5, 6 y 7 días se sacrificaron y se extirparon los bazo. Se analizó el número de células T CD8⁺ (A), el porcentaje de células T CD8⁺ respecto a esplenocitos totales (B), el número de células T memoria CD8⁺CD44⁺ (C) y el porcentaje de células T memoria CD8⁺CD44⁺ respecto a esplenocitos totales (D). El grupo de
10 ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi (■) presentan mayor número de células T CD8⁺ que el resto de los grupos: pApo-hIL15 (□), pHIL15 + pSushi (▲), pHIL15 (Δ), pApo (○) y vehículo salino (*). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pApo-hIL15 + pSushi y el grupo pHIL15 + pSushi * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

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

25 **Figura 5.** Aumento del número total y porcentaje de células T CD8⁺ respecto a los linfocitos de sangre periférica. Ratones C57B16 recibieron por vía hidrodinámica las distintas construcciones con pHIL15. A los 3, 4, 5 y 6 días se obtuvo sangre y se estudió el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (A), el de células T memoria CD8⁺CD44⁺ (B), y los porcentajes de células memoria efectoras CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (C) y centrales CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (D). En todas las
30 poblaciones estudiadas, el grupo de ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi (■) presentaron mayor porcentaje de células T CD8⁺ que el resto de los grupos: pApo-hIL15 (□), pHIL15 + pSushi (▲), pHIL15 (Δ), pApo (●), pSushi (▽) y vehículo salino (*). Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 3 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pApo-hIL15 + Sushi y el grupo pHIL15 + pSushi *
35 $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Figura 6. Efecto antitumoral en el tiempo (t (d), en días) de las construcciones en el modelo de tumor subcutáneo CT26. Ratones Balb/c recibieron por vía subcutánea 5×10^5 células CT26 y a los 3 días fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, pHIL15, pHIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). Se
40 midieron los tumores en mm² con un calibre digital cada 2 días (A), y se observó el tiempo de supervivencia (% SV) de los animales (B). Se vio que los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi presentaron un retraso en el crecimiento de los tumores y una mayor supervivencia que los ratones del resto de los

grupos. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 8 animales por grupo.

Figura 7. Efecto antitumoral en el tiempo (t (d): en días) de los plásmidos en el modelo de tumor subcutáneo MC38.

5 Ratones C57B16 recibieron por vía subcutánea 5×10^5 células MC38 y a los 6 días fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, phIL15, phIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). Se midieron los tumores en mm^2 con un calibre digital cada 2 días (A), y se observó el tiempo de supervivencia (% SV) de los animales (B). Se vio que los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi presentaron un retraso en el crecimiento de los tumores. Se muestra la media y el error estándar de la media de un
10 experimento representativo.

Figura 8. Efecto antimetastásico de los distintos plásmidos en el modelo de tumor intraesplénico MC38. Ratones

C57B16 recibieron por vía intraesplénica 5×10^5 células MC38 y al día siguiente fueron tratados por vía hidrodinámica con pApo-hIL15, pApo-hIL15 + pSushi, phIL15, phIL15 + pSushi, pApo o con solución salina (S). A los 19 días se
15 sacrificaron los ratones y se dividieron los ratones en 3 grupos: I, ratones fallecidos debido a las metástasis hepáticas o con metástasis generalizada; II, ratones que presentan metástasis en parte del tejido hepático; III, ratones libres de metástasis hepática. Se muestran datos de un experimento representativo.

Figura 9. Efecto de los distintos plásmidos en ratones “knock out” para el receptor α de IL15. Cuatro ratones

20 carentes del receptor α de IL15 fueron tratados por hidrodinámica con los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi, phIL15 y pSushi, pApo y pApo-hIL15. Se sacrificaron a los 5 días, se extrajo el bazo y se estudiaron las poblaciones esplénicas de células NK y linfocitos T CD8^+ memoria mediante citometría de flujo usando el marcador CD3 para su diferenciación. En la figura se incluye además las poblaciones de NK y T CD8^+ memoria de un ratón C57B16 no mutado. Se muestra el porcentaje de células NK (A) de los ratones estudiados, los linfocitos T CD8^+ (B) y la subpoblación $\text{CD8}^+\text{CD44}^+$ (C). Se indican los porcentajes de células respecto a los esplenocitos totales.
25

Figura 10. Aumento del número total de esplenocitos y de células T CD8^+ y NK1.1. Grupos de ratones C57B16

fueron tratados por inyección hidrodinámica con los plásmidos: 1) pmSushi-mIL15-mApo; 2) pApo-hIL15 en combinación con pSushi (pApo-hIL15 + pSushi); 3) pApo-hIL15; 4) phIL15 en combinación con pSushi (phIL15 +
30 pSushi); 5) phIL15 y 6) pApo. A los 6 días se sacrificaron y se extirparon los bazos. Se estudiaron mediante citometría de flujo A) la población de esplenocitos totales; B) los linfocitos T CD8^+ memoria ($\text{CD8}^+\text{CD3}^+$); y C) de células NK ($\text{NK1.1}^+\text{CD3}^+$). El grupo de ratones a los que se les administró pmSushi-mIL15-mApo presentaron mayor número de células T CD8^+ respecto a los esplenocitos totales que el resto de los grupos. Se muestra la media y el error estándar de la media de un experimento representativo con 2-3 animales por grupo. Los datos se analizaron
35 mediante ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni comparando el grupo de pmSushi-mIL15-mApo con el resto de los grupos inyectados con plásmidos codificantes de las proteínas indicadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Figura 11. Efecto comparativo de la isoforma humana o murina de IL15 en el aumento del número total de

40 esplenocitos y en el porcentaje de células T CD8^+ y células NK respecto a los esplenocitos totales. Grupos de ratones C57BL/6 fueron tratados por inyección hidrodinámica con los plásmidos: 1) pmIL15; 2) phIL15; 3) pmIL15 en combinación con pSushi; y 4) phIL15 en combinación con pSushi. A los 4 días se sacrificaron y se aislaron los bazos y se contaron los esplenocitos totales (A), las células T CD8 respecto al número de esplenocitos totales (B), y las

células NK respecto al número de esplenocitos totales (C). Se muestra la media y el error estándar de la media (en su caso) de un experimento representativo con 1-2 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante test Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple de Dunn's. Las figuras muestran que mL15 y hIL15 estimulan el número de esplenocitos y células T CD8 y NK en bazo de forma similar.

5 **Figura 12.** Efecto de la fusión de mSushi con mL15 y ApoA1 en el porcentaje de células NK en bazo (A) y en hígado (B). Grupos de ratones C57BL/6 fueron tratados por inyección hidrodinámica con los plásmidos: 1) pmSushi-mL15-mApo, administrados a distintas dosis de 1 µg/ratón, 2,5 µg/ratón, y 5 µg/ratón respectivamente; y 2) pmSushi-mL15 en combinación con pApo, administrados ambos a las 3 mismas dosis. A los 4 días se sacrificaron y se
10 aislaron los bazos (A) y los hígados (B) y se marcaron las células NK (NK1.1⁺CD3⁺). En todas las dosis estudiadas, el grupo de ratones a los que se les administró el plásmido pmSushi-mL15-mApo presentó mayor porcentaje de células NK que el resto de los grupos. Se muestra cada replicado y la media de un experimento representativo con 2-3 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía.

15 **Figura 13.** Efecto antitumoral de la fusión de mSushi con mL15 y ApoA1 en el modelo de tumor subcutáneo MC38. Ratones C57BL/6 recibieron por vía subcutánea 5×10^5 células MC38 y a los 8 y 19 días fueron tratados por vía hidrodinámica con los plásmidos: 1) pApo; 2) pmSushi-mL15-mApo y 3) pApo-hIL15 en combinación con pSushi (pApo-hIL15 + pSushi). Se midieron los tumores en mm² con un calibre digital cada 2-3 días. Se vio que los ratones a los que se les administró pmSushi-mL15-mApo presentaron un retraso en el crecimiento de los tumores. Se
20 muestra la media y el error estándar de un experimento representativo con 5-9 animales por grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la coadministración de un ácido
25 nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende IL15 fusionada a la proteína ApoA junto con el dominio sushi de la cadena α del receptor de IL15 (en adelante IL15 α R-sushi) resulta en una actividad de IL15 superior a la observada cuando se administran conjuntamente IL15 e IL15 α R-sushi. Dicha actividad superior es resultado no sólo de los mayores y más duraderos niveles circulantes de IL15 obtenidos tal y como se observa en el ejemplo 3 de la presente invención, sino en la capacidad de inducir la proliferación de células CTLL2 (ejemplo 4 de la presente
30 invención), la capacidad de promover la proliferación de linfocitos T CD8 y CD8 memoria intraesplénicos, de linfocitos T CD8 intrahepáticos y de linfocitos T CD8 en sangre (ejemplo 5 de la presente invención) y en un mayor efecto antitumoral en dos modelos experimentales de tumores (ejemplo 7 de la presente invención) y en un efecto anti-metastático (ejemplo 8 de la presente invención).

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

40 Más sorprendente aún resulta la observación de que la administración de un ácido nucleico que codifica y permite la expresión de una proteína de fusión triple que comprende la proteína ApoA1 fusionada a IL15 y a IL15 α R-sushi produce una proliferación de linfocitos CD8 y células NK muy superior a la que se obtiene con la administración de

un ácido nucleico que codifica IL15, bien sea solo o combinado con otro que codifica IL15αR-sushi, o con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de ApoA1 con IL15, bien sea solo o combinado con otro que codifica IL15αR-sushi.

5 COMPOSICIONES DE LA INVENCION

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

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

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

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

El término “polinucleótido”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como deoxiribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados mediante metilación o así como formas

no modificadas. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente invención e incluyen mRNA, cDNA y polinucleótidos recombinantes. Según se usa en la presente invención, los polinucleótidos no están limitados a polinucleótidos tal y como aparecen en la naturaleza, sino que incluye polinucleótidos en los que aparecen análogos de nucleótidos y enlaces internucleotídicos no naturales. Ejemplos no limitantes de este tipo de estructuras no naturales incluyen polinucleótidos en los que el azúcar es distinto a la ribosa, polinucleótidos en los que aparecen enlaces fosfodiéster 3'-5' y 2'-5', polinucleótidos en los que aparecen enlaces invertidos (3'-3' y 5'-5') y estructuras ramificadas. Adicionalmente, los polinucleótidos de la invención incluyen enlaces internucleotídicos no naturales tales como péptidos ácidos nucleicos (PNA o peptide nucleic acids), ácidos nucleicos cerrados (LNA or locked nucleic acids), enlaces C1-C4 alquilfosfonato del tipo de metilfosfonato, fosforamidato, C1-C6 alquilfosfotriéster, fosforotioato y fosforoditioato. En cualquier caso, los polinucleótidos de la invención mantienen la capacidad de hibridar con ácidos nucleicos diana de forma similar a polinucleótidos naturales.

Primer componente de la composición de la invención

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

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

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

40 Por "variante funcionalmente equivalente de ApoA-I" se entiende todas aquellos polipéptidos que resultan de la inserción, sustitución o delección de uno o más amino ácidos de la secuencia de ApoA-I mencionada anteriormente y que mantienen sustancialmente intacta la capacidad de interactuar con el denominado "scavenger receptor de clase B tipo I" (SR-BI) que forma el receptor de HDL presente en las células hepáticas. La capacidad de interactuar con el receptor de HDL se determina esencialmente tal y como ha sido descrito por Monaco et al

(EMBO J., 1987, 6:3253-3260) bien mediante estudios de unión de ApoA-I a las membrana de hepatocitos o bien mediante la determinación de la capacidad de ApoA-I o de su variante de inhibir la unión de HDL a los receptores de las membranas de los hepatocitos. Preferiblemente, la constante de disociación de la unión de la variante de ApoA-I a las membranas de hepatocitos es de al menos 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M o 10^{-4} M.

5

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

10

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

15

20

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

25

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

30

35

Alternativamente, el primer componente de la invención puede ser un ácido nucleico que muestra una identidad de secuencia de al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, la menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente en donde el porcentaje de identidad se determina mediante el uso de un algoritmo del tipo GAP, BESTFIT o FASTA cuya implementación informática

40

aparece en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) y en el que se usan los algoritmos locales de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2:482), de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443) o de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1988, 85:2444) usando los valores por defecto para los distintos parámetros.

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

20 Segundo componente de la composición de la invención

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

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

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

- la capacidad de promover la proliferación de células T CD8+ determinado, por ejemplo, mediante el método descrito por Montes, et al, (Clin. Exp. Immunol., 2005, 142:292-302) basado en la incubación de una

población de células mononucleares de sangre periférica con un péptido antigénico en presencia de la variante de IL15 seguido de la determinación del porcentaje de células que pueden ser marcadas con anticuerpos específicos frente a CD8),

- 5 - la capacidad de promover la activación de células NK tras ser presentada en trans por las células dendríticas. Esta capacidad puede ser determinada mediante la medida de la incorporación de timidina tritiada por parte de las células NK CD56+ en presencia de IL15 o mediante la medida de la secreción por parte de las células NK de la citoquina GM-CSF. Métodos para determinar ambas funcionalidades de IL15 han sido descritos por Carson, W. et al. (J.Exp.med., 1994, 180:1395-1403), macrófagos y neutrófilos.
- 10 - La capacidad de IL15 de inhibir la apoptosis mediada por Fas en células precursoras de células B, tal y como ha sido descrito por Demirci et al. (Cell Mol Immunol. 2004, 1:123-8.), que puede ser determinado usando técnicas estándar de determinación de apoptosis tales como TUNEL o la determinación de la fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio.

Variantes de IL15 contempladas en el contexto de la presente invención incluyen polipéptidos que muestran al menos un 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, ó 95% de similitud o identidad con los polipéptidos de IL15 de mamíferos mencionados anteriormente. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J., 1990, Mol. Biol. 20 215:403-410).

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

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

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

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

la propia secuencia señal de IL15 tal y como se definió anteriormente o la secuencia señal de una las inmunoglobulina, en particular, de Igk o de IgV λ .

Tercer componente de la composición de la invención

5

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

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

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

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

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

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

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

El tercer componente de la invención puede ser un ácido nucleico que codifica al menos un dominio sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 nativas y variantes del mismo mencionadas anteriormente. Los ácidos nucleicos

que codifican IL15R α -sushi de mamíferos pueden ser recuperados a partir de las secuencias de las cadenas alfa correspondientes que se encuentran en los repositorios de ácidos nucleicos e incluyen, sin limitación, las secuencias que codifican IL15R α -sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 humano (números de acceso en NCBI corresponden a U31628, SEQ ID NO:19) y de ratón (número de acceso en NCBI: U22339, SEQ ID NO:20).

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

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

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

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

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

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

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

proteína de fusión que comprende (i) un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente de la misma y (ii) IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

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

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

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

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

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

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

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

Enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen:

- Enlazadores que comprenden 2 aminoácidos o más seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina tales como, sin limitación, los enlazadores de secuencia SGGTSGSTSGTGST

(SEQ ID NO:23), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO:24), GGSGGAP (SEQ ID NO:25) y GGGVEGGG (SEQ ID NO: 26) descritos por Muller, K.M. et al. ((Methods. Enzimology, 2000, 328: 261-281).

- Enlazadores basados en los residuos 53-56 de la tetranectina, que en la tetranectina forma una lámina β , y los residuos 57-59 que forman un giro en la tetranectina (Nielsen, B.B. et al., FEBS Lett. 412: 388-396, 1997) tales como el enlazador de secuencia GTKVHMK (SEQ ID NO:27),
- Enlazadores basados en una subsecuencia de la lámina de conexión 3 de la fibronectina humana, correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 tales como el enlazador PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 28) correspondiente a los aminoácidos número 2037-2049, y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 29) correspondiente a los residuos de aminoácidos 2038-2042 es más preferible.
- Enlazador basado en la secuencia de 10 residuos de aminoácidos de la región bisagra superior de la IgG3 murina tales como el enlazador de secuencia PKPSTPPGSS (SEQ ID NO: 30) que ha sido usado para la producción de anticuerpos dimerizados mediante una hélice enrollada (Pack P. y Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584),
- El péptido enlazador de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO:31)
- El péptido enlazador de secuencia GGSGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:32)
- El péptido enlazador de secuencia GAP.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las proteínas de fusión pueden presentar el polipéptido ApoA en posición N-terminal con respecto a IL-15 o el polipéptido IL-15 en posición N-terminal con respecto a Apo A. Asimismo, ambos componentes pueden encontrarse

unidos directamente o a través de un enlazador, que puede ser cualquiera de los enlazadores mencionados en la presente invención. Asimismo, los componentes pueden ser de origen humano o murino, de forma que la invención contempla fusiones de ApoA e IL15 de origen humano, fusiones de ApoA e IL15 de origen murino y fusiones de ApoA e IL15 en donde ApoA es de origen humano e IL15 es de origen murino y fusiones de ApoA e IL15 en donde ApoA es de origen murino e IL15 de origen humano.

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

10 PROTEÍNA DE FUSIÓN DE LA INVENCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión presenta un ordenamiento del tipo C-B-A, es decir, comprende, en sentido N- a C terminal, el dominio Sushi de IL15R α (región C), IL15 (región B) y ApoA1 (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:32). En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:32) y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP.

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

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

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión presenta un ordenamiento del tipo C-B-A en donde los tres componentes son de origen humano y en donde tanto las regiones C y B como las regiones B y A se encuentran conectadas por enlazadores peptídicos. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, en sentido N- a C- terminal, el dominio sushi de IL15R α humano (región C), IL15 humana (región B) y ApoA1 humano (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ. En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende la secuencia definida por SEQ ID NO:42.

En otra forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, en sentido N- a C terminal, el dominio sushi de IL15 α murino (región C), IL15 murino (región B) y ApoA1 murino (región A). En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ. En otra forma de realización, las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma de realización aún más preferida, las regiones C y B se encuentran separadas por un enlazador del tipo GGSGGGSGGGSGGGSLQ y las regiones B y A se encuentran separadas por un enlazador del tipo GAP. En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende la secuencia definida por SEQ ID NO:43.

10 POLINUCLEÓTIDOS, CONSTRUCCIONES GÉNICAS, VECTORES Y CÉLULAS HOSPEDADORAS DE LA INVENCION

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

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

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

El polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención puede encontrarse operativamente asociado a una región reguladora de la expresión dando lugar así a una construcción génica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende un polinucleótido de la invención. Preferiblemente, la construcción comprende el polinucleótido de la invención situado bajo el control operativo de secuencias que regulan la expresión del polinucleótido de la invención. El experto en la materia apreciará que los

polinucleótidos de la invención deben acceder al núcleo de un tejido diana y allí transcribirse y traducirse para dar lugar a la proteína de fusión biológicamente activa.

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

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

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

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook

et al., 2001, citado *supra*). En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

5 Células huésped adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin estar limitado, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, 10 células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células 15 ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

MÉTODOS IN VITRO DE LA INVENCION

20 Se ha descrito la capacidad de IL15 de promover la proliferación de linfocitos T sensibilizados por un antígeno. Así, se ha demostrado que la puesta en contacto de una población de linfocitos aislados previamente expuestos a un determinado antígeno con IL15 resulta en un aumento en la proliferación de los linfocitos. Esta población expandida de linfocitos puede ser utilizada en una inmunoterapia adoptiva para lo cual es posteriormente re-administrada al 25 paciente del que se han obtenido dicha población inicial. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno que comprende poner en contacto una población de linfocitos previamente expuestos a dicho antígeno con una composición de la invención, una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una construcción génica de la invención o una célula huésped de la invención.

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

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

40 El término "antígeno", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier sustancia que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en un sujeto que no es tolerante a dicho antígeno. El antígeno puede proceder del propio sujeto, en cuyo caso se trata de un autoantígeno, o puede ser un aloantígeno, es decir, un antígeno

derivado de un individuo de la misma especie. Alternativamente, el antígeno puede ser un xenoantígeno, es decir, un antígeno derivado de un individuo de una especie diferente.

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

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

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

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

En el caso de que el antígeno sea un antígeno tumoral, es posible usar un extracto de tumor autólogo y/o un antígeno de tumor recombinante. En el caso de un antígeno procedente de un patógeno, la activación de los

linfocitos previa a su expansión se puede llevar a cabo usando una célula infectada con un patógeno, por ejemplo un virus que presenta antígenos del patógeno.

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

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

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

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

COMPOSICIONES FARMACEÚTICAS DE LA INVENCION

40 Las composiciones, polinucleótidos y proteínas de fusión de la invención resultan de utilidad para el tratamiento de enfermedades que requieren una dosis prolongada de IL15. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición, una

proteína de fusión, un polinucleótido, una construcción génica, un vector o una célula hospedadora de acuerdo a la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

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

Tabla 1

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

<0.95	quilomicrones	100-1000	<2	8	7	84
-------	---------------	----------	----	---	---	----

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

5

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

10

En el caso de que la composición farmacéutica de la invención comprenda ácidos nucleicos (los polinucleótidos de la invención, los vectores o las construcciones génicas), la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, *DNA Cell Biol.*, 21:857-867).

15

20

Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugadas a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D.melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al. , 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393). Alternativamente, el polinucleótido puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en retrovirus, tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

25

30

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

35

40

polinucleótido entra en contacto con las células del órgano diana antes de que se mezcle con la sangre reduciendo así las posibilidades de degradación por nucleasas.

5 Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 ó 0,00001 mg por cada kg de peso corporal y menos de 200 nmol de agente, es decir, en torno a 4.4×10^{16} copias por kg de peso corporal o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15 ó 0,075 nmol por Kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica. Las composiciones y polinucleótidos bifuncionales de la invención pueden ser administradas directamente en el órgano en el que se
10 exprese el ARNm diana en cuyo caso se administran dosis de entre 0,00001 mg a 3 mg por órgano, o preferiblemente entre 0,0001 y 0,001 mg por órgano, en torno a 0,03 y 3,0 mg por órgano, en torno a 0,1 y 3,0 mg por órgano o entre 0,3 y 3,0 mg por órgano.

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

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

35 USOS TERAPEÚTICOS DE LAS COMPOSICIONES Y PROTEÍNAS DE FUSION DE LA INVENCION

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

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

de una estimulación de la respuesta inmune innata (mediada por células NK) o adaptativa (mediada por linfocitos CD8).

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

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

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

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

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

30 Por tanto, la capacidad de los compuestos y composiciones de la invención de aumentar la respuesta inmune de un sujeto a un determinado antígeno puede ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades asociadas a la presencia de dicho antígeno en el organismo, lo que incluye enfermedades causadas por infecciones virales si se trata de un antígeno viral, enfermedades causadas por infecciones bacterianas si se trata de un antígeno bacteriano, enfermedades causadas por infecciones fúngicas si se trata de un antígeno fúngico, alergias si se trata de un alérgeno, enfermedades causadas por una infestación parasitaria si se trata de un antígeno parasitario y/o un tumor si se trata de un antígeno específico de células tumorales. Por tanto, en formas preferidas de realización, la enfermedad que requiere una activación del sistema inmune se selecciona del grupo de una enfermedad infecciosa y una enfermedad neoplásica.

40 Enfermedades causadas por infecciones virales que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por la infecciones por el virus VIH-1 (SIDA), por el herpesvirus humanos tales como el virus del herpes simple (herpes simple, herpes genital), citomegalovirus (mononucleosis, retinitis, hepatitis), el virus de Epstein Barr (mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo) y el virus de la varicela zóster (varicela, herpes zóster); por los virus de la hepatitis tales

como virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C, por paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano; flavivirus tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o el virus de la encefalitis japonesa) y rotavirus. Otro tipo de infecciones virales que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la presente invención se describen en detalle en Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991).

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

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

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

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

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

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

El cáncer que va a tratarse en el contexto de la presente invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Estos tumores o cáncer incluyen, y no se limitan a, neoplasias ubicadas en colon, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, hipófisis, testículos, ovarios, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y aparato genitourinario y, más particularmente, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer hepatocelular en adultos (primario), cáncer de hígado en adultos (primario), leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, enfermedad de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no de Hodgkin en adultos, cáncer de hígado en adultos primario, sarcoma del tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, tumores malignos relacionados con el SIDA, cáncer de ano, astrocitoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario), leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tallo cerebral infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma de la vía óptica y e hipotalámico infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no de Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma del tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de la vía óptica infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma de células T cutáneo, carcinoma de células de los islotes del páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer de páncreas exocrino, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragodanales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, cáncer de mama en la mujer, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer hipofaríngeo, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer pancreático de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama en el hombre, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer metastásico escamoso de cuello primario, cáncer metastásico escamoso de cuello, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin durante el embarazo, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma-Z fibroso maligno, osteosarcoma-W histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, paraproteinemias, púrpura, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de hígado primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, sarcoidosis, sarcomas, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma del tejido blando, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago,

tumores pineales y neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer tiroideo, cáncer de la pelvis renal y uréter de células de transición, cáncer de pelvis renal y uréter de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, glioma hipotalámico y de la vía óptica, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, ubicada en un sistema de órgano enumerado anteriormente.

COMPOSICIONES VACUNALES DE LA INVENCIÓN

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

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

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

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

35 Antígenos virales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen antígenos del VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humanos, (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos) o proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como gB o derivados de los mismos), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de los mismos), virus de la varicela zóster (tales como gpl, II, III y IE63), o de un virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos de núcleo, E1, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, de virus de la rubeola (tales como proteínas E1 y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humanos (por ejemplo HPV6,

11, 16, 18, eg LI, L2, EI, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células infectadas con virus influenza, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus), y similares (véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. 5 Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales).

Antígenos bacterianos o derivados adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen antígenos de *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* 10 (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (tales como adhesinas e invasinas de alto y de bajo peso molecular); antígenos de *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *Parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina de la tosferina o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M.* 15 *tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD de 19kDa [Rv3763], PPD de 38kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar 20 a la toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, 25 incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas del clostridium A o B y derivados de las 30 mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C.* 35 *trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana exterior poco comunes), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; antígenos de *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma* 40 *spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*,

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

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

Antígenos protozoarios adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como antígenos de superficie de merozoitos, antígenos de superficie de esporozoitos, antígenos de circumsporozoitos, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno de estadio en sangre pf, 55/RESA y otros componentes de antígenos de plasmoides; antígenos de *Toxoplasma* tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígeno de *Toxoplasma*; antígenos de esquistosoma tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de esquistosoma; el antígeno de *Leishmania* y otros antígenos de *Leishmania* tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígeno de *Leishmania*; y antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígeno de *Trypanosoma*.

Alérgenos o antígenos medioambientales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y el pelo de animales, y alérgenos de la comida. Alérgenos del polen importantes de árboles, césped y hierbas se originan a partir de órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales*, *Pinales* y *Platanaceae* incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de

- los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, pájaros, alérgenos de veneno incluyendo los que se originan de picaduras o mordeduras de insectos tales como los del orden taxonómico de *Hymenoptera* incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas y hormigas (superfamilia *Formicoidea*). Todavía otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.
- 5
- 10 Antígenos tumorales adecuados para su uso en vacunas que pueden ser usadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana
- 15 específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1,
- 20 NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p2lras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, γ -catenina, pl2Octn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40),
- 25 SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p2lras), cáncer biliar (p2lras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p2lras), carcinoma de colon (p2lras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico
- 30 (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p2lras, gp100Pme1117), mieloma (familia MUC, p2lras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno
- 35 específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítomos del VLTH-1).
- 40 Los componentes de las composiciones de la invención, en concreto, la fusión de Apo A e IL15 o el polinucleótido que codifica dicha fusión y el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o el ácido nucleico que codifica dicho dominio pueden presentarse como una única formulación (por ejemplo, como un comprimido o cápsula que comprende una cantidad fija de cada uno de los componentes) o, por el contrario, puede presentarse como

formulaciones separadas para posteriormente combinarlos para su administración conjunta, secuencial o separada. Las composiciones de la invención también contemplan la formulación como un kit-de-partes en donde los componentes se formulan separadamente pero se empaquetan en un mismo contenedor.

- 5 El experto en la materia apreciará que la formulación del primer y segundo componente de las composiciones de la invención pueden ser similares, es decir, formulados de manera semejante (por ejemplo, en comprimidos o en tabletas), lo que permite su administración por la misma vía. En una realización en la que los distintos componentes de la invención se formulan separadamente, los dos componentes se pueden presentar en blíster. Cada blíster contiene los medicamentos que tienen que ser consumidos a lo largo de un día. Si los medicamentos tienen que ser administrados varias veces al día, se pueden disponer los medicamentos correspondientes a cada administración en distintas secciones del blíster, preferiblemente anotando en cada sección del blíster el momento del día en el que deben ser administrados. Alternativamente, los componentes de la composición de la invención pueden ser formulados de forma distinta de manera que los distintos componentes se administren de forma distinta. Así, es posible, por ejemplo, que el primer componente se formule como comprimido o cápsula para su administración oral y
- 10 que el segundo componente se formule para su administración intravenosa.
- 15

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

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Origen y construcción de los plásmidos

5 1.1 Extracción de RNA

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

10 1.2 RT-PCR síntesis de cDNA total

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

15

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

pCMV-mApoA1 (pApo), comprende una secuencia SEQ.ID.NO. 1 que codifica un polipéptido que comprende la apolipoproteína A-I (Apoa1) murina precedida por su propio péptido señal, y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus;

20

Se diseñó el cebador sentido FwATGmApoA1: 5'-ATGAAAGCTGTGGTGCTGGC-3' (SEQ.ID.NO. 46), y el cebador antisentido RvTGmApoA1: 5'-TCACTGGGCAGTCAGAGTCT-3' (SEQ.ID.NO. 47) .

25 Se amplificó el cDNA de mApoA1 (795 nucleótidos totales, 72 nucleótidos codificantes para el péptido señal y 723 nucleótidos codificantes para la proteína nativa) mediante PCR sobre el cDNA total de hígado, usando BioTaq *DNA polimerase* (Bioline, Londres, Reino Unido): 5 min 94°C, 30 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 55°C y 40 seg a 72°C, seguido de 7 min a 72°C en termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). El producto de PCR fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El cDNA purificado de mApoA1 fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante, en el vector de expresión p*cDNA*TM3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pCMV-mApoA1 o también pApo. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

30

35 1.4 Clonaje de Interleuquina 15 humana (hIL15) y obtención del plásmido pCMV-hIL15

pCMV-hIL15 (pIL15), comprende una secuencia SEQ.ID.NO. 2 que codifica un polipéptido que comprende la IL15 humana precedida por el péptido señal de la cadena IgV λ , y que está operativamente unida al promotor del citomegalovirus;

40

Se diseñó el cebador sentido FwAsclhIL15: 5'-AATAATGGCGCGCCGAAGTGGATAGATG-3' (SEQ.ID.NO. 48),

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

y el cebador antisentido RvNotIhIL15:

5'-GTTTCATCAACACGTCCTGAGCGGCCGC-3' (SEQ.ID.NO. 49),

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

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

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

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

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

Se diseñó el cebador antisentido RvAsclmApoA1:

5'-GGCGCGCCCTGGGCAGTCAGAGTCTCGC-3' (SEQ.ID.NO.50),

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

Se amplificó por PCR, usando como molde el pCMV-mApoA1 (ver ejemplo 1.3), y los cebadores FwATGmApoA1 y RvAsclmApoA1, con la enzima BioTaq DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido), 5 min 94°C, 30 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 57°C y 40 seg a 72°C, seguido de 7 min a 72°C en termociclador 2720 *Thermal cycler* (Applied Biosystems Foster City, EE.UU.). El producto de PCR (804 nucleótidos) fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado de mApoA1-*Ascl* fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas, en el vector de expresión pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pCMV-mApoA1-*Ascl*. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

Paralelamente usando como molde el pTrcHis2-hIL15 (ver ejemplo 1.4) se digirió 50 min a 37°C con la enzima Ascl y Buffer 4 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado Ascl-hIL15- pTrcHis2 fue seguidamente digerido 50 min a 37°C con la enzima NotI,
 5 1xBsa y Buffer 3 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA), obteniendo el DNA purificado Ascl-hIL15-NotI (345 nucleótidos).

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

25

1.6 Origen del plásmido pSushi

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

30

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

35 1.7 Clonaje de cDNA de Interleuquina 15 murina (mIL15) y obtención del plásmido pCMV-mSushi-mIL15 (pmSushi-mIL15)

pCMV-mSushi-mIL15 (pmSushi-mIL15), comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi de la cadena α de receptor de la IL15 murino (IL15ra), unido a la IL15 murina mediante un enlazador flexible del tipo GGSGGGGSGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:32).

40

El gen que codifica el dominio Sushi fusionado a la IL15 murina seguido de dos codones de terminación flanqueados por un sitio de restricción NheI 3' y otro XhoI en 5' fue sintetizado por GENEART AG (GENEART AG, BioPark, Josef-

Engert- Straße 11, 93053 Regensburg, Germany) e introducido en el plásmido pSecTag2/Hygro A (Invitrogen, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt, Germany).

5 La expresión del dominio Sushi fusionado a la IL15 murina está bajo el control del promotor del citomegalovirus y su secreción es dirigida bajo el péptido señal Igk-de cadenaV-J2 .

1.8 Construcción del plásmido pCMV-mSushi-mIL15-mApoA1 (pmSushi-mIL15-mApo) que codifica la fusión génica de mSushi, mIL15 y mApoA1

10 pCMV-mSushi-mIL15-mApoA1, comprende una secuencia SEQ ID NO:45 que codifica una proteína de fusión que comprende el dominio Sushi de la cadena α del receptor de IL15 murino (IL15ra), la IL15 murina, y la apolipoproteína A-I murina.

15 Se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia Sushi fusionado a la IL15 murina y unirle al mismo tiempo la secuencia de 9 nucleótidos (GGCGCGCCC) que constituye un sitio de restricción para la enzima Ascl en 3' del gen y elimina el codón de terminación. Esta secuencia de restricción añadida permitirá el clonaje con una secuencia de Apo que contiene la secuencia Ascl en 5' y se traducirá en un péptido de unión corto GAP, que dará cierta movilidad a las proteínas constituyentes.

20 Los cebadores fueron:

Fw Sushi 5'-ATGGAGACAGACACCCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 51)

Rv IL15 Ascl: 5'-GGGCGCGCCGCTGGTGTGATGAACAT-3' (SEQ ID NO: 52)

25 Se amplificó la secuencia por PCR, usando como molde el pmSushi-mIL15 descrito en el ejemplo anterior, y los cebadores Fw Sushi y Rv IL15 Ascl, con la enzima BioTaq DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido), 1 min 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 45 seg a 72°C, seguido de 2 min a 72°C en termociclador 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems Foster City, EE.UU.). El producto de PCR fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y purificado el fragmento de gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). El DNA purificado fue clonado, siguiendo las instrucciones provistas, en el
30 vector de expresión pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen, Carlsbed, CA), que denominaremos pCMV-mSushi-mIL15-Ascl. Finalmente, se confirmó la secuencia obtenida mediante secuenciación.

35 Para realizar la fusión génica el plásmido pCMV-mIFN-Ascl-mApo (descrito en la solicitud de patente WO2009150284 y que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión entre mIFN y mApo), se digirió 50 min a 37°C con las enzimas Ascl y NcoI en Buffer 4 (New England Biolabs). El producto de digestión fue migrado en gel de agarosa 1% Agarose D-1 low EEO (Pronadisa, Madrid, España), y la banda superior que contenía el vector abierto sin la secuencia IFN fue purificada del gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). Se realizó la digestión del plásmido pCMV-mSushi-mIL15-Ascl utilizando las mismas enzimas y condiciones. En este caso se purificó la banda inferior que contenía el fragmento mSushi-mIL15. Se ligaron ambos fragmentos
40 purificados en un ratio 1:3 (vector: inserto) usando la ligasa T4 DNA ligase High Concentration y como solución tampón el 2X Rapid Ligation Buffer (Promega Madison, WI, U.S.A.), incubando la mezcla 10 min a temperatura ambiente. Se transformaron posteriormente bacterias Top10 (Invitrogen, Carlsbed, CA). Las bacterias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en placas de Petri con medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un

gen de resistencia a este antibiótico. Se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias positivas mediante la técnica de MiniPrep (Qiagen, Alemania) para, posteriormente, digerir 2 µg de dicho plásmido con las enzimas *AscI/PmeI* (New England Biolabs) y separar por electroforesis el resultado de dicha digestión en un gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia del inserto. El plásmido resultante se denominará en adelante pCMV-mSushi-mIL15-mApoA1 o también pmSushi-mIL15-mApo.

Ejemplo 2. Modelos experimentales

2.1 Animales

Los experimentos han sido realizados en ratones inmunocompetentes BALB/c y C57BL/6 hembras entre 5-7 semanas (Harlan, Barcelona, Spain). Se utilizaron ratones “knock-out” para el gen *IL15Rα* (Lodolce et al. *IL15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. Immunity* 1998; 9: 669-676). Los animales fueron tratados según normas éticas de experimentación animal, bajo condiciones específicas libres de patógenos externos.

2.2 Manipulación animal

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

2.3 Líneas celulares

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

La línea MC38 proviene de un adenocarcinoma murino.

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

2.4 Determinación de hIL15

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

2.5 Citometría de flujo

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

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

15 Las células fueron resuspendidas en 50 µL de PBS y se incubaron durante 10 min a 4°C en oscuridad con la mezcla de anticuerpos correspondientes. Posteriormente se realizaron dos lavados y se analizaron en un citómetro FACScalibur® (BD Bioscience, San Diego, CA, EEUU). El análisis posterior de los datos se realizó con el programa Flow Jo Versión 5.7.2.

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

2.6 Análisis estadístico de los datos

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

Ejemplo 3. Niveles circulantes de hIL15 tras administración hidrodinámica de construcciones plasmídicas

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

35 Se obtuvieron muestras de suero a las 8, 24, 96, 168 y 240 horas y se determinó la concentración de hIL15 en ellos mediante un ELISA sándwich. Los sueros de los ratones que recibieron el plásmido control que expresa la ApoA1 no contenían niveles detectables de hIL15 (Figura 1). Los ratones que habían sido inyectados con el plásmido que expresa hIL15 presentaron concentraciones máximas de hIL15 a las 8h que disminuían rápidamente (Figura 1). En cambio, los ratones que recibieron los plásmidos que codifican para el ApoA1-hIL15 (con o sin coinfección del plásmido pSushi) presentaron concentraciones más altas de hIL15 sérica a las 8h, que siguieron aumentando hasta 40 las 24h. A las 168h se podía detectar hIL15 en los ratones tratados con pApo-hIL15 por contraposición a los que se

observa ratones inyectados con pHL15 (Figura 1). Por lo tanto, las construcciones que expresan las proteínas de fusión ApoA1-hIL15 consiguen niveles circulantes superiores y más duraderos de hIL15.

En conclusión, la administración hidrodinámica del plásmido pApo-hIL15 induce altas concentraciones de hIL15 sérica muy superiores a la producida por la administración de pHL15.

Ejemplo 4. Ensayo funcional en células CTLL2

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

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

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

Ejemplo 5. Estimulación de proliferación de linfocitos CD8

Para estudiar la posible actividad inmunoestimuladora de las construcciones expresadas en el hígado mediante inyección hidrodinámica, en primer lugar se analizó el aumento del número de linfocitos T CD8 en el bazo. Para ello, se inyectaron los plásmidos mediante inyección hidrodinámica y 3, 4, 5, 6 y 7 días más tarde, se disgregaron los bazos para obtener una suspensión unicelular, se contaron las células totales y, tras marcar los linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD44 se analizaron mediante citometría de flujo de múltiples colores. La inyección conjunta de los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi aumentó el número de linfocitos T CD8 del bazo en mayor medida que el resto de los tratamientos (Figura 3A). Lo mismo ocurrió con el número de linfocitos T CD8 memoria determinados como células CD3+, CD8+, CD44hi (Figura 3C). El porcentaje de células T CD8 y CD8 memoria respecto a los esplenocitos totales también fue superior en el grupo de los ratones a los que se les administraron los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi si se comparan con el resto de los grupos (Figuras 3B y 3D).

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

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

Los estudios del número y porcentaje de linfocitos T CD8 demuestran que la administración de pApo-hIL15 y pSushi induce poblaciones más abundantes de linfocitos T CD8 en bazo, hígado y sangre periférica que la administración de los otros plásmidos. Específicamente, la administración de pApo-hIL15 y pSushi resulta en una población significativamente mayor de linfocitos T CD8 en bazo, hígado y sangre que la administración de las construcciones pHL15 y pSushi.

Ejemplo 6. Efecto antitumoral de las construcciones basadas ApoA1 y hIL15 en el modelo de CT26 subcutáneo.

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

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

Ejemplo 7. Efecto antitumoral de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en el modelo de MC38 subcutáneo

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

En el grupo de ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi se observó un retraso en el crecimiento de los tumores que no resultó estadísticamente significativo (Figura 7a). El 37,6% de los ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi sobrevivió los 64 días de la inoculación del tumor y no presentaban tumor visible (Figura 7b). El 16,7% de los ratones tratados con el plásmido pApo sobrevivió, al igual que el 40% de los ratones tratados con pApo-hIL15, 17% de los tratados con pHL15 y el 33% de los que recibieron únicamente vehículo salino (S). Ningún ratón del grupo de pHL15 + pSushi sobrevivió.

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

Ejemplo 8. Efecto antimetastásico de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en el modelo de MC38 intraesplénico

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

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

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

En el grupo de ratones tratados con pApo-hIL15 y pSushi un 71% presentó un hígado libre de metástasis, frente al 30% de ratones tratados con pApo-hIL15, el 25% en tratados con pHL15 + pSushi, 20% de los que recibieron salino (S) y 0% de los grupos de pHL15 y pApo (Figura 8).

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

Ejemplo 9. Efecto de la administración de las construcciones basadas en ApoA1 y hIL15 en ratones “knock out” para el receptor α de IL15

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

El objetivo de este experimento fue observar si pApo-hIL15 y pSushi podían modificar este fenotipo. Se inyectaron cuatro ratones, uno con los plásmidos pApo-hIL15 y pSushi, otro con pHL15 y pSushi, otro con pApo y finalmente otro con pApo-hIL15. A los cinco días se sacrificaron los ratones, se extrajo el bazo y se estudiaron las poblaciones esplénicas de células NK y linfocitos T CD8 memoria mediante citometría de flujo (Figura 9).

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

10 **Ejemplo 10. Efecto de la administración de una construcción triple, basada en la fusión de Sushi, IL15 y ApoA1.**

15 Para estudiar la posible actividad inmunoestimuladora del plásmido pmSushi-mIL15-mApo con la construcción triple descrito en el ejemplo 1.8., se realizó un nuevo ensayo de proliferación de linfocitos CD8, de modo semejante a como se describe en el ejemplo 5.

Para ello, se establecieron grupos de ratones C57BL/6 (2-3 animales por grupo de tratamiento), a los que se inyectó, mediante inyección hidrodinámica, el plásmido a ensayar (2,5 μ g/ratón). Seis días más tarde, se disgregaron los bazos para obtener una suspensión unicelular, se contaron las células totales y, tras marcar los linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD44 y las células NK con anticuerpos anti-CD3, anti-NK1.1, se analizaron mediante citometría de flujo de múltiples colores.

Los plásmidos a ensayar en los distintos grupos de tratamiento fueron:

- pmSushi-mIL15-mApo;
- 25 - pApo-hIL15 en combinación con pSushi (pApo-hIL15 + pSushi);
- pApo-hIL15;
- pHIL15 en combinación con pSushi (pHIL15 + pSushi);
- pHIL15; y
- pApo.

30 En este ensayo, para el grupo de animales tratados con el plásmido pmSushi-mIL15-mApo, que codifica la proteína de fusión triple, se observó una proliferación del número de células esplénicas notablemente mayor que la observada para el resto de grupos de tratamiento (Figura 10A). Igualmente, el tratamiento con pmSushi-mIL15-mApo indujo una proliferación del número de linfocitos T CD8 (Figura 10B) y de células NK (Figura 35 10C) muy significativamente mayor que la observada con el resto de tratamientos.

Ejemplo 11. Efecto sobre la estimulación de proliferación de células T CD8 y NK en el bazo de ratón de las construcciones que codifican para la IL15 murina y para la IL15 humana.

40 Se estudió comparativamente la actividad estimuladora sobre el número de esplenocitos de las construcciones que codifican para las moléculas mIL15 y hIL15 mediante la administración de los plásmidos correspondientes por inyección hidrodinámica (10 μ g/ratón) co-administrados o no con el plásmido pSushi. Cuatro días después se disgregaron los bazos para obtener una suspensión unicelular, se contaron las células totales y, tras marcar los

linfocitos T CD8 con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 y las células NK con anticuerpos anti-NK1.1 y anti-CD-3, se analizaron mediante citometría de flujo de múltiples colores.

5 Las inyecciones del plásmido pmIL15 y del plásmido pHL15 indujeron un número similar de esplenocitos, así como porcentajes similares de células T CD8 y NK (Figura 11). Así mismo al coadministrar los plásmidos de pmIL15 o pHL15 con pSushi, se observó que los bazo de los ratones inyectados con el plásmido codificante para la proteína humana presentaban un mayor porcentaje de células T CD8 y NK, aunque esta tendencia no resultó estadísticamente significativa (test de Kruskal-Wallis).

10 **Ejemplo 12. Efecto de la fusión de mSushi con mL15 y Apo en el porcentaje de células NK en bazo y en hígado.**

El plásmido pmSushi-mL15-mApo, que codifica la proteína de fusión triple, aumenta el número de células NK en el bazo y en el hígado en mayor medida que el plásmido pmSushi-mL15 coadministrado con el plásmido pApo.

15 Se establecieron grupos de ratones C57BL/6, a los que se inyectó, mediante inyección hidrodinámica, el plásmido a ensayar:

- pmSushi-mL15-mApo, a una dosis de 1 µg/ratón;
- pmSushi-mL15-mApo, a una dosis de 2,5 µg/ratón;
- pmSushi-mL15-mApo, a una dosis de 5 µg/ratón;
- 20 - pmSushi-mL15 en combinación con pApo, a una dosis de 1 µg/ratón;
- pmSushi-mL15 en combinación con pApo, a una dosis de 2,5 µg/ratón; y
- pmSushi-mL15 en combinación con pApo, a una dosis de 5 µg/ratón;

25 Cuatro días después se disgregaron los bazo para obtener una suspensión unicelular y se aislaron las células linfoides del hígado por centrifugación con Percoll®. Se marcaron las células NK con anticuerpos anti-NK1.1 y anti-CD-3 se analizaron mediante citometría de flujo de múltiples colores. La inyección de pmSushi-mL15-mApo indujo la presencia de un mayor porcentaje de células NK en el bazo y en el hígado que la coadministración de pmSushi-mL15 y pApo (pSushi-mL15 + pApo) (Figura 12).

30 **Ejemplo 13. Efecto antitumoral de una construcción triple, basada en la fusión de Sushi, IL15 y ApoA1 en el modelo de MC38 subcutáneo.**

Para continuar el estudio del efecto antitumoral del plásmido pmSushi-mL15-mApo con la construcción triple descrito en el ejemplo 1.8., se eligió el modelo de tumor subcutáneo. En ratones C57B16 se inyectaron 5×10^5 células de la línea MC38 por vía subcutánea y se trataron a los 8 y 19 días con las diferentes construcciones. Los plásmidos a ensayar en los distintos grupos de tratamiento fueron:

- pApo;
- pmSushi-mL15-mApo;
- pApo-hIL15 en combinación con pSushi (pApo-hIL15 + pSushi);

40 Para ello, se establecieron grupos de ratones C57BL/6 portadores de nódulos tumorales: 5 ratones fueron tratados con pApo; 8 ratones fueron tratados con pmSushi-mL15-mApo y 9 ratones fueron tratados con pApo-hIL15 + pSushi

a los que se inyectó, mediante inyección hidrodinámica, el plásmido a ensayar pApo (1 µg/ratón), pmSushi-mIL15-mApo (1 µg/ratón) y pApo-hIL15 + pSushi (10 µg/ratón de cada uno).

Se midió el tamaño de los tumores calculando el producto de 2 diámetros 2 veces por semana con un calibre digital y los ratones se sacrificaron cuando su tamaño era superior a 246mm².

- 5
- En el grupo de ratones tratados con pmSushi-mIL15-mApo, que codifica la proteína de fusión triple, se observó un retraso en el crecimiento de los tumores que no resultó estadísticamente significativo (Figura 13). El 33,3% de los ratones tratados con pmSushi-mIL15-mApo no presentaba tumor visible al final del estudio (a los 29 días de la inoculación) y solo el 33,3% presentaba tumores de superficie >40mm². El 20% de los ratones tratados con el
- 10 plásmido pApo presentaba tumor visible el día del sacrificio (29 días) y el 80% de los ratones presentaba un tumor >40mm², mientras ningún ratón tratado con pApo-hIL15+ pShushi estaba libre de tumor al final del estudio (día 29) y el 80% de los ratones tenía un tumor >40mm² pese a que recibieron una dosis 10 veces mayor de los plásmidos por separado que de la triple fusión.
- 15 Estos datos indican que el tratamiento con pmSushi-mIL15-mApo tiene ciertos efectos antitumorales en el modelo de tumor subcutáneo MC38.

LISTA DE SECUENCIAS

- 20 <110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.
RESEARCH CENTER BORSTEL
- <120> CONJUGADOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA Y
TRATAMIENTO ANTI-TUMORAL
- 25 <130> P5443PC00
- <160> 52
- 30 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 267
<212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
- 40 1 5 10 15
- Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

ES 2 463 016 T3

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

ES 2 463 016 T3

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
195 200 205

5 Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
10 225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
245 250 255

15

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
260 265

20

<210> 2
<211> 264
<212> PRT
<213> Mus musculus

25

<400> 2

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

30

Gln Ala Trp His Val Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp
20 25 30

35

Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser
35 40 45

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

ES 2 463 016 T3

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val
65 70 75 80

5 Ser Gln Leu Gln Glu Arg Leu Gly Pro Leu Thr Arg Asp Phe Trp Asp
85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Val Arg Gln Glu Met Asn Lys Asp
10 100 105 110

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

15

Lys Lys Trp Lys Glu Asp Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Ala Pro
130 135 140

20

Leu Gly Ala Glu Leu Gln Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu Gln Glu Leu
145 150 155 160

25 Gln Gly Arg Leu Ser Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg
165 170 175

Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro His Ser Glu Gln
30 180 185 190

Met Arg Glu Ser Leu Ala Gln Arg Leu Ala Glu Leu Lys Ser Asn Pro
195 200 205

35

Thr Leu Asn Glu Tyr His Thr Arg Ala Lys Thr His Leu Lys Thr Leu
210 215 220

40

Gly Glu Lys Ala Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg His Ser Leu Met
225 230 235 240

ES 2 463 016 T3

Pro Met Leu Glu Thr Leu Lys Thr Lys Ala Gln Ser Val Ile Asp Lys
245 250 255

5

Ala Ser Glu Thr Leu Thr Ala Gln
260

10

<210> 3
<211> 259
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

15

<400> 3

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

20

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

25

Arg Val Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser
35 40 45

30

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

35

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Asp Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val
65 70 75 80

40

Gly Arg Leu Gln Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Ala
85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Leu Arg Asn Glu Met Asn Lys Asp
100 105 110

ES 2 463 016 T3

Leu Glu Asn Val Lys Gln Lys Met Gln Pro His Leu Asp Glu Phe Gln
115 120 125

5

Glu Lys Trp Asn Glu Glu Val Glu Ala Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Pro
130 135 140

10

Leu Gly Thr Glu Leu His Lys Asn Ala Lys Glu Met Gln Arg His Leu
145 150 155 160

15

Lys Val Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Val Asn Ala Asp
165 170 175

20

Ala Leu Arg Ala Lys Phe Gly Leu Tyr Ser Asp Gln Met Arg Glu Asn
180 185 190

25

Leu Ala Gln Arg Leu Thr Glu Ile Lys Asn His Pro Thr Leu Ile Glu
195 200 205

30

Tyr His Thr Lys Ala Ser Asp His Leu Lys Thr Leu Gly Glu Lys Ala
210 215 220

35

Lys Pro Ala Leu Asp Asp Leu Gly Gln Gly Leu Met Pro Val Leu Glu
225 230 235 240

40

Ala Trp Lys Ala Lys Ile Met Ser Met Ile Asp Glu Ala Lys Lys Lys
245 250 255

Leu Asn Ala

45

<210> 4

<211> 965

ES 2 463 016 T3

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

5  gaattcaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagag agactgcgag      60
   aaggaggtcc cccacggccc ttcaggatga aagctgcggt gctgaccttg gccgtgctct      120
   tcctgacggg gagccaggct cggcatttct ggcagcaaga tgaaccccc cagagcccct      180
10  gggatcgagt gaaggacctg gccactgtgt acgtggatgt gctcaaagac agcggcagag      240
   actatgtgtc ccagtttgaa ggctccgctt tgggaaaaca gctaaaccta aagctccttg      300
   acaactggga cagcgtgacc tccaccttca gcaagctgcg cgaacagctc ggccctgtga      360
   cccaggagtt ctgggataac ctggaaaagg agacagaggg cctgaggcag gagatgagca      420
   aggatctgga ggaggtgaag gccaaagtgc agccctacct ggacgacttc cagaagaagt      480
20  ggcaggagga gatggagctc taccgccaga aggtggagcc gctgcgcgca gagctccaag      540
   agggcgcgcg ccagaagctg cacgagctgc aagagaagct gagcccactg ggcgaggaga      600
   tgcgcgaccg cgcgcgcgcc catgtggacg cgctgcgcac gcatctggcc ccctacagcg      660
   acgagctgcg ccagcgcttg gccgcgcgcc ttgaggctct caaggagaac ggcgcgcgca      720
   gactggccga gtaccacgcc aaggccaccg agcatctgag cacgctcagc gagaaggcca      780
30  agcccgcgct cgaggacctc cgccaaggcc tgctgcccgt gctggagagc ttcaagggtca      840
   gcttctgag  cgctctcgag  gactacacta  agaagctcaa  caccagtgga  ggcgcccgcc      900
35  gccgcccccc ttcccgtgct tcagaataaa cgtttccaaa gtgggaaaaa aaaaaaaaag      960
   aattc                                             965

```

40 <210> 5

<211> 924

<212> DNA

<213> Mus musculus

ES 2 463 016 T3

```

<400> 5
accccagact gtcggagagc tccggggagg tcacccacac ccttcaggat gaaagctgtg      60

5  gtgctggccg tggctctggt cttcctgaca gggagccagg cttggcacgt atggcagcaa      120

   gatgaacccc agtcccaatg ggacaaagtg aaggatttcg ctaatgtgta tgtggatgcg      180

   gtcaaagaca gcggcagaga ctatgtgtcc cagtttgaat cctcctcctt gggccaacag      240
10  ctgaacctga atctcctgga aaactgggac actctggggt caaccgttag tcagctgcag      300

   gaacggctgg gccattgac tcgggacttc tgggataacc tggagaaaga aacagattgg      360

15  gtgagacagg agatgaacaa ggacctagag gaagtgaac agaaggtgca gccctacctg      420

   gacgaattcc agaagaaatg gaaagaggat gtggagctct accgccagaa ggtggcgcct      480

   ctgggcgccc agctgcagga gagcgcgcgc cagaagctgc aggagctgca agggagactg      540
20  tcccctgtgg ctgaggaatt tcgcgaccgc atgcgcacac acgtagactc tctgcgcaca      600

   cagctagcgc cccacagcga acagatgcgc gagagcctgg cccagcgcct ggctgagctc      660

25  aagagcaacc ctacctgaa cgagtaccac accagggcca aaaccacct gaagacactt      720

   ggcgagaaag ccagacctgc gctggaggac ctgcgccata gtctgatgcc catgctggag      780

   acgcttaaga ccaaagccca gagtgtgatc gacaaggcca gcgagactct gactgcccag      840
30  tgaggtgcc  gcttccactc cccacccccg cattggcttt cttacaataa acctttccaa      900

   aatggaaaaa aaaaaaaaaa aaaa      924

35
<210> 6
<211> 889
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

40
<400> 6
agactgttgg agagctccgg gggaggtcgc cacatccttc aggatgaaag ctgcagtgtt      60

```

ES 2 463 016 T3

ggctgtggcc ctggtcttcc tgacaggttg ccaagcttgg gagttctggc agcaagatga 120
 gccccagtcc caatgggaca gggatgaagga tttcgccact gtgtatgtgg atgcagtcaa 180
 5 ggacagcggc agagactatg tgtcccagtt tgaatcctcc actttgggca aacagctgaa 240
 cctgaatctc ctggacaact gggacactct gggttcaact gttggtcgcc tacaggaaca 300
 gctagggcca gtgactcagg agttctgggc taacctggag aaagaaacag attggctgag 360
 10 aaacgagatg aacaaggacc tggagaatgt gaaacagaag atgcagcccc acctggatga 420
 attccaggag aagtggaacg aggaggtcga ggcctaccgc cagaagctgg agcctctggg 480
 15 caccgagctt cacaaaaacg cgaaggagat gcaaaggcat ctaaaggttg tggccgagga 540
 gtttcgagac cgcattcgtg tgaatgcaga cgcgctgcmc gcaaagtttg ggctctacag 600
 cgatcagatg cgcgagaacc tggcccagcg cctgaccgag atcaagaacc acctaccct 660
 20 gatcgagtat cataccaagg ccagcgacca cctgaagaca cttggtgaga aagccaaacc 720
 cgcgctggat gacctgggcc agggcctgat gccggtgctg gaagcctgga aggccaaaat 780
 25 catgagtatg atcgatgagg ccaaaaagaa gctgaacgct tagtgaggcg cccgtcacca 840
 ctccccaccc ctgaattggc tttcttacia taaacgtttc caaagtggg 889

 30 <210> 7
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 35 <400> 7

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

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

ES 2 463 016 T3

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

5

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60

10

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

15

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

20

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100 105 110

25

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

30

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

35

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

35

Thr Ser

40

<210> 8
<211> 162
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

ES 2 463 016 T3

<210> 9

<211> 162

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

10 Met Lys Ile Leu Lys Pro Tyr Met Arg Asn Thr Ser Ile Leu Tyr Tyr
1 5 10 15

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

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

Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile
50 55 60

25 Gln Phe Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His
65 70 75 80

30 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

35 Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg
100 105 110

Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val
115 120 125

40 Ile Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Arg Asn Phe
130 135 140

ES 2 463 016 T3

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

5

Thr Ser

10

<210> 10
<211> 162
<212> PRT
<213> Felis catus

15

<400> 10

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

20

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

25

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

30

Asn Trp Gln Asp Val Ile Ser Asp Leu Lys Ile Ile Asp Lys Ile Ile
 50 55 60

35

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

40

Pro Asn Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu His
 85 90 95

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

ES 2 463 016 T3

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

5

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

10

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

15 Thr Ser

<210> 11

20 <211> 162

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

25

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

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

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

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

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

ES 2 463 016 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

Thr Ser

25

<210> 12

<211> 411

<212> DNA

30 <213> Artificial

<220>

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

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(66)

40 <223> Secuencia que codifica el péptido señal de la cadena IgV-ji

<220>

<221> mis_feature

ES 2 463 016 T3

<222> (67)..(411)

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

5 <400> 12
atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtct 60
agagccaact gggatgaatgt aataagtgat ttgaaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 120
10 atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 180
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt 240
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaca acagtttgtc ttctaattggg 300
15 aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaaa tattaaagaa 360
tttttcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg a 411
20
<210> 13
<211> 489
<212> DNA
<213> Mus musculus
25
<400> 13
atgaaaattt tgaaccata tatgaggaat acatccatct cgtgctactt gtgtttcctt 60
ctaaacagtc actttttaac tgaggctggc attcatgtct tcattttggg ctgtgtcagt 120
30 gtaggtctcc ctaaacaga ggccaactgg atagatgtaa gatatgacct ggagaaaatt 180
gaaagcctta ttcaatctat tcatattgac accactttat aactgacag tgactttcat 240
35 ccagttgca aagttactgc aatgaactgc tttctcctgg aattgcaggt tattttacat 300
gagtacagta acatgactct taatgaaaca gtaagaaacg tgctctacct tgcaaacagc 360
actctgtott ctaacaagaa tgtagcagaa tctggctgca aggaatgtga ggagctggag 420
40 gagaaaacct tcacagagtt tttgcaaagc tttatacgca ttgtccaaat gttcatcaac 480
acgtcctga 489

ES 2 463 016 T3

<210> 14
 <211> 489
 5 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 14
 atgaaaattt tgaaccata tatgaggaat acatccatct tgtactacct gtgtttcctt 60
 10 ctcaacagtc acttcttaac tgaggctggc atccatgtct tcattttggg ctgtgtcagt 120
 gtaggtctcc ctaaaacaga ggccaaactgg atagatgtaa gatacgatct ggagaaaatt 180
 15 gaaagtotta ttcaatttat tcatattgat actactctat aactgacag tgactttcat 240
 cccagttgca aagttactgc aatgaactgc tttctcctgg aattacaggt tattttgcac 300
 gagtacagta acatgactct taatgaaaca gtaagaaacg tgctctacct tgcaaacagc 360
 20 actctgtcct ctaacaagaa tgtaatagag tctggctgca aggaatgtga ggagctggag 420
 gagagaaact tcacggagtt tttgcagagt tttatacata ttgtccaaat gttcatcaac 480
 25 acgtcctga 489

<210> 15
 <211> 489
 30 <212> DNA
 <213> *Felis catus*

<400> 15
 atgagaattt tgaaccata tttgagaagt acttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
 35 ctgaacagcc attttttaac tgaagcttgc attcctgttt tcattttgag ctgtattaat 120
 gcaggtcttc ctaaaacaga ggccaaactgg caggatgtaa taagtgattt gaaaataatt 180
 40 gacaagatta ttcaatcctt acatatogat gccactttat atactgaaag tgatgttcat 240
 cccaattgca aagtaacagc gatgaagtgc tttctcctgg agttacatgt tatttcgctt 300

ES 2 463 016 T3

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

5

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

10

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

15 <210> 18
<211> 61
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 18

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

25

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

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

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

<210> 19
<211> 291
40 <212> DNA
<213> Artificial

<220>

ES 2 463 016 T3

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

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(288)
<223> Secuencia que codifica el péptido señal y el dominio Sushi de la subunidad alfa del receptor de IL15 humano (IL15RA) (NM_002189.2
10 REGION: 83 ..371)

<400> 19
atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60

15 ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctcccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcggtgtt gaacaaggcc 240
20 acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagactg a 291

<210> 20
25 <211> 273
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
30 <223> Secuencia que codifica un polipéptido que comprende el dominio Sushi del Receptor IL15alfa murino (Il15ra)

<220>
35 <221> misc_features
<222> (1)..(64)
<223> Secuencia que codifica un péptido señal de Ig-kappa

<220>
40 <221> misc_features
<222> (65)..(273)
<223> Secuencia que codifica el dominio Sushi de la subunidad alpha del receptor de la IL15 (Il15ra) murino

ES 2 463 016 T3

<400> 20
 atggagacag acaccctgct gctctgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg ctctaccggc 60
 5 gacggcacca cctgccctcc cctgtgttcc atcgagcacg ccgacatcag agtgaagaac 120
 tactccgtga actctcggga gagatacgtg tgcaactccg gcttcaagcg gaaggccggc 180
 acctccaccc tgatcgagtg cgtgatcaac aagaacacca acgtggccca ctggaccacc 240
 10 ccttcctga agtgcacccg ggacccttcc tga 273

<210> 21
 15 <211> 279
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 20 atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
 ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctcccccat gtccgtggaa 120
 cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
 25 tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtggt gaacaaggcc 240
 acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgc 279

30
 <210> 22
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 22
 Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 40
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
 20 25 30

ES 2 463 016 T3

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

5

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

10

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

15

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

<210> 23

20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> Enlazador

<400> 23

Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr

30

1 5 10

<210> 24

<211> 15

35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

40

<400> 24

Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr

ES 2 463 016 T3

1 5 10 15

<210> 25

5 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

10 <223> Enlazador

<400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro

15 1 5

<210> 26

<211> 8

20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

25

<400> 26

Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly

30 1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

40 <400> 27

Gly Thr Lys Val His Met Lys

1 5

ES 2 463 016 T3

<210> 28
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador
10
<400> 28

Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln
1 5 10
15

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

25 <400> 29

Gly Thr Ser Gly Gln
1 5

30
<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
35
<220>
<223> Enlazador

<400> 30
40
Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

ES 2 463 016 T3

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10 <400> 31

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr

1

5

10

15

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Enlazador

<400> 32

25

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

10

15

30 Ser Leu Gln

<210> 33

35 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Sitio de cote de enteroquinasa

<400> 33

ES 2 463 016 T3

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

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

10 <220>
<223> Sitio de corte de Factor Xa

<400> 34

15 Ile Glu Asp Gly Arg
1 5

<210> 35
20 <211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 35

Leu Val Pro Arg Gly Ser
30 1 5

<210> 36
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de proteasa TEV
40
<400> 36

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

ES 2 463 016 T3

1 5

<210> 37

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Sitio de corte de proteasa PreScission

<400> 37

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

15 1 5

<210> 38

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sitio de corte de MMP9

25

<400> 38

Leu Phe Pro Thr Ser

1 5

30

<210> 39

<211> 1155

<212> DNA

35 <213> Artificial

<220>

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

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(801)

ES 2 463 016 T3

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

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (802)..(810)

<223> Secuencia que codifica el enlazador GAP

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (811)..(1153)

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

15 <400> 39

atgaaagctg cggtgctgac cttggccgtg ctcttctctga cggggagcca ggctcggcat 60

ttctggcagc aagatgaacc cccccagagc ccctgggatc gagtgaagga cctggccact 120

20 gtgtacgtgg atgtgctcaa agacagcggc agagactatg tgtcccagtt tgaaggctcc 180

gccttgggaa aacagctaaa cctaaagctc cttgacaact gggacagcgt gacctccacc 240

ttcagcaagc tgcgcgaaca gctcggccct gtgaccagg agttctggga taacctggaa 300

25 aaggagacag agggcctgag gcaggagatg agcaaggatc tggaggaggt gaaggccaag 360

gtgcagccct acctggacga cttccagaag aagtggcagg aggagatgga gctctaccgc 420

30 cagaaggtgg agccgctgcg cgcagagctc caagagggcg cgcgccagaa gctgcacgag 480

ctgcaagaga agctgagccc actgggagag gagatgcgcg accgcgcgcg cgcccatgtg 540

gacgcgctgc gcacgcatct ggccccctac agcgacgagc tgcgccagcg cttggccgcg 600

35 cgccttgagg ctctcaagga gaacggcggc gccagactgg ccgagtacca cgccaaggcc 660

accgagcatc tgagcacgct cagcgagaag gccaaagccc cgctcgagga cctccgccaa 720

40 ggctgctgc ccgtgctgga gagcttcaag gtcagcttcc tgagcgtctt cgaggagtac 780

actaagaagc tcaacaccca gggcgcgccc aactgggtga atgtaataag tgatttghaa 840

ES 2 463 016 T3

```

aaaattgaag atcttattca atctatgcat attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat      900

gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg aagtgccttc tcttgaggtt acaagttatt      960

5  tcacttgagt cgggagatgc aagtattcat gatacagtag aaaatctgat catcctagca    1020

aacaacagtt tgtcttctaa tggaatgta acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa    1080

ctggaggaaa aaaatattaa agaatTTTTG cagagTTTTG tacatattgt ccaaagtTTC    1140
10 atcaacactt ctga                                                    1155

```

```

<210> 40
15 <211> 1146
    <212> DNA
    <213> Artificial

<220>
20 <223> Secuencia que codifica una proteína de fusión mApo-hIL15

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (1)..(792)
    <223> Secuencia que codifica la apolipoproteína A-I murina (Apoa1)
        (NM_009692.2 REGION: 47 .. 838)

<220>
30 <221> misc_feature
    <222> (793)..(800)
    <223> Secuencia que codifica el enlazador GAP

<220>
35 <221> misc_feature
    <222> (801)..(1143)
    <223> Secuencia que codifica la IL15 humana madura (NM_172174.2 REGION:
        990 ..1331)

40 <400> 40
    atgaaagctg tgggtctggc cgtggctctg gtcttctctga cagggagcca ggcttggcac      60

    gtatggcagc aagatgaacc ccagtcccaa tgggacaaag tgaaggattt cgctaatgtg      120

```

ES 2 463 016 T3

	tatgtggatg cggtcaaaga cagcggcaga gactatgtgt cccagtttga atcctcctcc	180
	ttgggccaac agctgaacct gaatctcctg gaaaactggg aactctctggg ttcaaccggt	240
5	agtcagctgc aggaacggct gggcccattg actcgggact tctgggataa cctggagaaa	300
	gaaacagatt gggtgagaca ggagatgaac aaggacctag aggaagtga acagaagggtg	360
10	cagccctacc tggacgaatt ccagaagaaa tggaaagagg atgtggagct ctaccgccag	420
	aaggtggcgc ctctgggcgc cgagctgcag gagagcgcgc gccagaagct gcaggagctg	480
	caagggagac tgtcccctgt ggctgaggaa tttcgcgacc gcatgcgcac acacgtagac	540
15	tctctgcgca cacagctagc gccccacagc gaacagatgc gcgagagcct ggcccagcgc	600
	ctggctgagc tcaagagcaa ccctaccttg aacgagtacc acaccagggc caaaaccac	660
20	ctgaagacac ttggcgagaa agccagacct gcgctggagg acctgcgcca tagtctgatg	720
	cccatgctgg agacgcttaa gaccaaagcc cagagtgtga tcgacaaggc cagcgagact	780
	ctgactgccc agggcgcgcc caactgggtg aatgtaataa gtgatttgaa aaaaattgaa	840
25	gatcttattc aatctatgca tattgatgct actttatata cggaaagtga tgttcacccc	900
	agttgcaaag taacagcaat gaagtgcttt ctcttgaggt tacaagttat ttcaacttgag	960
30	tccggagatg caagtattca tgatacagta gaaaatctga tcatcctagc aaacaacagt	1020
	ttgtcttcta atgggaatgt aacagaatct ggatgcaaag aatgtgagga actggaggaa	1080
	aaaaatatta aagaatTTTT gcagagTTTT gtacatattg tccaaatggt catcaacact	1140
35	tcttga	1146
	<210> 41	
40	<211> 1290	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 463 016 T3

<220>

<223> mApoI-mIL15

<400> 41

5	atgaaagctg tgggtgctggc cgtggctctg gtcttctctga cagggagcca ggcttggcac	60
	gtatggcagc aagatgaacc ccagtcccaa tgggacaaag tgaaggattt cgctaattgtg	120
	tatgtggatg cggtcaaaga cagcggcaga gactatgtgt cccagtttga atcctcctcc	180
10	ttgggccaac agctgaacct gaatctcctg gaaaactggg aactctctggg ttcaaccggt	240
	agtcagctgc aggaacggct gggcccattg actcgggact tctgggataa cctggagaaa	300
15	gaaacagatt ggggtgagaca ggagatgaac aaggacctag aggaagtga acagaagggtg	360
	cagccctacc tggacgaatt ccagaagaaa tggaaagagg atgtggagct ctaccgccag	420
	aagtgggcgc ctctggggcgc cgagctgcag gagagcgcgc gccagaagct gcaggagctg	480
20	caagggagac tgtcccctgt ggctgaggaa tttcgcgacc gcatgcgcac acacgtagac	540
	tctctgcgca cacagctagc gccccacagc gaacagatgc gcgagagcct ggcccagcgc	600
25	ctggctgagc tcaagagcaa ccctaccttg aacgagtacc acaccagggc caaaaccac	660
	ctgaagacac ttggcgagaa agccagacct gcgctggagg acctgcgcca tagtctgatg	720
	cccatgctgg agacgcttaa gaccaaagcc cagagtgtga tcgacaaggc cagcgagact	780
30	ctgactgcc agggcgcgcc catgaaaatt ttgaaacct atatgaggaa tacatccatc	840
	tcgtgctact tgtgtttcct tctaaacagt cactttttaa ctgaggctgg cattcatgtc	900
35	ttcattttgg gctgtgtcag tgtaggtctc cctaaaacag aggccaactg gatagatgta	960
	agatatgacc tggagaaaat tgaaagcctt attcaatcta ttcattattga caccacttta	1020
	tacactgaca gtgactttca tcccagttgc aaagttactg caatgaactg ctttctcctg	1080
40	gaattgcagg ttattttaca tgagtacagt aacatgactc ttaatgaaac agtaagaaac	1140
	gtgctctacc ttgaaaacag cactctgtct tctaaacaaga atgtagcaga atctggctgc	1200

ES 2 463 016 T3

aaggaatgtg aggagctgga ggagaaaacc ttcacagagt ttttgcaaag ctttatacgc 1260

attgtccaaa tgttcatcaa cacgtcctga 1290

5

<210> 42

<211> 443

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> hSushi-hIL15-hApoA1

15 <400> 42

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

20

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

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

30 Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

35

Ser Leu Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
85 90 95

40

Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
100 105 110

ES 2 463 016 T3

Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
115 120 125

5

Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp
130 135 140

10

Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn
145 150 155 160

15

Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu
165 170 175

20

Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met
180 185 190

25

Phe Ile Asn Thr Ser Gly Ala Pro Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
195 200 205

30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
210 215 220

35

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
225 230 235 240

40

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
245 250 255

45

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp
260 265 270

50

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys
275 280 285

ES 2 463 016 T3

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe
290 295 300

5

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu
305 310 315 320

10

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu
325 330 335

15

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala
340 345 350

20

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp
355 360 365

25

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn
370 375 380

30

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
385 390 395 400

35

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
405 410 415

40

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
420 425 430

40

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
435 440

<210> 43

ES 2 463 016 T3

<211> 459
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> mSushi-mIL15-mApoA1

<400> 43

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

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

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

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

25 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Gln
65 70 75 80

30 Thr Glu Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Val Ser Val Gly
85 90 95

35 Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu
100 105 110

40 Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr
115 120 125

Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys
130 135 140

ES 2 463 016 T3

5 Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr
145 150 155 160

10 Leu Asn Glu Thr Val Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu
165 170 175

15 Ser Ser Asn Lys Asn Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu
180 185 190

20 Leu Glu Glu Lys Thr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile
195 200 205

25 Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Gly Ala Pro Asp Glu Pro Gln Ser
210 215 220

30 Gln Trp Asp Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val
225 230 235 240

35 Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ser Leu
245 250 255

40 Gly Gln Gln Leu Asn Leu Asn Leu Leu Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly
260 265 270

45 Ser Thr Val Ser Gln Leu Gln Glu Arg Leu Gly Pro Leu Thr Arg Asp
275 280 285

50 Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Val Arg Gln Glu Met
290 295 300

55 Asn Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Gln Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp

ES 2 463 016 T3

	310	315	320
5	Glu Phe Gln Lys Lys Trp Lys Glu Asp Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys 325	330	335
10	Val Ala Pro Leu Gly Ala Glu Leu Gln Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu 340	345	350
15	Gln Glu Leu Gln Gly Arg Leu Ser Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp 355	360	365
20	Arg Met Arg Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro His 370	375	380
25	Ser Glu Gln Met Arg Glu Ser Leu Ala Gln Arg Leu Ala Glu Leu Lys 385	390	395
30	Ser Asn Pro Thr Leu Asn Glu Tyr His Thr Arg Ala Lys Thr His Leu 405	410	415
35	Lys Thr Leu Gly Glu Lys Ala Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg His 420	425	430
40	Ser Leu Met Pro Met Leu Glu Thr Leu Lys Thr Lys Ala Gln Ser Val 435	440	445
45	Ile Asp Lys Ala Ser Glu Thr Leu Thr Ala Gln 450	455	
40	<210> 44 <211> 1428 <212> DNA <213> Artificial		

ES 2 463 016 T3

<220>

<223> Secuencia que codifica una proteína de fusión hSushi-hIL15-hApo

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(288)

<223> Secuencia que codifica el péptido señal y el dominio Sushi de la

10 subunidad alfa del receptor de IL15 humano (IL15RA) (NM_002189.2
REGION: 83 ..371)

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (289)..(345)

<223> Secuencia que codifica un enlazador (Linker)

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (346)..(687)

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

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (688)..(696)

<223> Secuencia que codifica el enlazador GAP (Linker)

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (697)..(1425)

<223> Secuencia que codifica la apolipoproteína A-I humana madura
(APOA1) (NM_000039.1 REGION: 111..839)

35 <400> 44

atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60

ctgctgctcc ggccgcgggc gacgcggggc atcacgtgcc ctcccccat gtccgtggaa 120

40 cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180

tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtggt gaacaaggcc 240

ES 2 463 016 T3

	acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagacgg cggctctgga	300
	ggtggaggat cggcggagg atctggcggc ggaggaagcc tgcagaactg ggtgaatgta	360
5	ataagtgatt tgaaaaaat tgaagatctt attcaatcta tgcattattga tgctacttta	420
	tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg	480
	gagttacaag ttatttctact tgagtccgga gatgcaagta ttcattgatac agtagaaaat	540
10	ctgatcatcc tagcaaaca cagtttgtct tctaattggga atgtaacaga atctggatgc	600
	aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaat attaaagaat ttttgcagag ttttgtacat	660
15	attgtccaaa tgttcatcaa cacttctggc gcgcccgatg aacccccca gagcccctgg	720
	gatcgagtga aggacctggc cactgtgtac gtggatgtgc tcaaagacag cggcagagac	780
	tatgtgtccc agtttgaagg ctccgccttg ggaaaacagc taaacctaaa gtccttgac	840
20	aactgggaca gcgtgacctc caccttcagc aagctgcgcg aacagctcgg ccctgtgacc	900
	caggagtctt gggataacct ggaaaaggag acagagggcc tgaggcagga gatgagcaag	960
25	gatctggagg aggtgaaggc caaggtgcag ccctacctgg acgacttcca gaagaagtgg	1020
	caggaggaga tggagctcta ccgccagaag gtggagccgc tgcgcgcaga gctccaagag	1080
	ggcgcgcgcc agaagctgca cgagctgcaa gagaagctga gccactggg cgaggagatg	1140
30	cgcgaccgcg cgcgcccca tgtggacgcg ctgcgcacgc atctggcccc ctacagcgac	1200
	gagctgcgcc agcgttggc cgcggcctt gaggtctca aggagaacgg cgcgccaga	1260
35	ctggccgagt accacgcaa ggccaccgag catctgagca cgctcagcga gaaggccaag	1320
	cccgcgctcg aggacctcg ccaaggcctg ctgccctgctc tggagagctt caaggtcagc	1380
	ttctgagcg ctctcgagga gtacactaag aagctcaaca cccagtga	1428
40		
	<210> 45	
	<211> 1407	

ES 2 463 016 T3

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

5 <223> mSushi-mIL15-mApoA1 cDNA

<400> 45

	atggagacag acaccctgct gctctgggtg ctgctgctgt ggtgcccgg ctctaccggc	60
10	gacggcacca cctgccctcc cctgtgtcc atcgagcacg ccgacatcag agtgaagaac	120
	tactccgtga actctcggga gagatacgtg tgcaactccg gcttcaagcg gaaggccggc	180
	acctccaccc tgatcgagtg cgtgatcaac aagaacacca acgtggccca ctggaccacc	240
15	ccttccctga agtgcacccg ggacccttcc ggcggctctg gaggtggagg atccggcggg	300
	ggatctggcg gcggaggaag cctgcaggag gccaaactgga tcgacgtgcg ctacgacctg	360
20	gagaagatcg agtcctgat ccagtccatc cacatcgaca ccaccctgta caccgactcc	420
	gacttccacc cttcctgcaa ggtgaccgcc atgaactgct ttctgctgga gctgcagggtg	480
	atcctgcacg agtactccaa catgaccctg aacgagacag tgcggaacgt gctgtacctg	540
25	gccaaactcca cctgtcctc caacaagaac gtggccgagt ccggctgcaa ggagtgcgag	600
	gagctggagg agaagacctt caccgagttt ctgcagtctt tcatccggat cgtgcagatg	660
30	ttcatcaaca ccagcggcgc gcccgatgaa ccccagtccc aatgggacaa agtgaaggat	720
	ttcgtaatg tgtatgtgga tgcggtcaaa gacagcggca gagactatgt gtcccagttt	780
	gaatcctcct ccttgggcca acagctgaac ctgaatctcc tggaaaactg ggacactctg	840
35	ggttcaaccg ttagtcagct gcaggaacgg ctgggcccac tgactcggga cttctgggat	900
	aacctggaga aagaaacaga ttgggtgaga caggagatga acaaggacct agaggaagtg	960
40	aaacagaagg tgcagcccta cctggacgaa ttccagaaga aatggaaaga ggatgtggag	1020
	ctctaccgcc agaaggtggc gcctctgggc gccgagctgc aggagagcgc gcgccagaag	1080

ES 2 463 016 T3

ctgcaggagc tgcaagggag actgtcccct gtggctgagg aatttcgga cgcgatgccc 1140
acacacgtag actctctgcg cacacagcta ggcgccaca gcgaacagat gcgagagagc 1200
5 ctggcccagc gcctggctga gctcaagagc aaccctacct tgaacgagta ccacaccagg 1260
gccaaaacc acctgaagac acttgccgag aaagccagac ctgcgctgga ggacctgccc 1320
catagtctga tgccatgct ggagacgctt aagaccaaag cccagagtgt gatcgacaag 1380
10 gccagcgaga ctctgactgc ccagtga 1407

<210> 46
15 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador FwATGmApoA1

<400> 46
atgaaagctg tggctgctggc 20

25
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

30
<220>
<223> Cebador RvTGmApoA1

<400> 47
35 tcactgggca gtcagagtct 20

<210> 48
<211> 28
40 <212> DNA
<213> Artificial

<220>

ES 2 463 016 T3

<223> Cebador FwAscIhIL15

<400> 48
aataatggcg cgccgaactg gatagatg 28

5

<210> 49
<211> 27
<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador RvNotIhIL15

15 <400> 49
gttcatcaac acgtcctgag cggccgc 27

<210> 50

20 <211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador RvAscImApoA1

<400> 50
ggcgcgcctt gggcagtcag agtctcgc 28

30

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

35

<220>
<223> Cebador Fw Sushi

<400> 51

40 atggagacag acaccctgct g 21

<210> 52

ES 2 463 016 T3

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador Rv IL15 AscI

<400> 52
gggcgcgccg ctggtggtga tgaacat

27

10

REIVINDICACIONES

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

2. Una composición según la reivindicación 1 en donde el primer y segundo componente forman parte de una única molécula y en donde
 - a. si el primer y segundo componentes son polipéptidos, dicha única molécula es una proteína de fusión que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA e IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 y
 - b. si el primer y segundo componentes son polinucleótidos, dicha única molécula es un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA e IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15.

3. Una composición según la reivindicación 2 en donde el ordenamiento del primer y segundo componente en dicha única molécula se selecciona del grupo consistente en
 - a. el primer componente se encuentra en posición N terminal o 5' con respecto al segundo componente y
 - b. el primer componente se encuentra en posición C terminal o 3' con respecto al segundo componente.

4. Una proteína de fusión que comprende

- (i) una región A formada por un polipéptido Apo A o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con dicho polipéptido ApoA,
- (ii) una región B formada por IL15 o una variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 y
- 5 (iii) una región C formada por el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15.
- 10 5. Una proteína de fusión según la reivindicación 4 en donde el ordenamiento de las regiones A, B y C en sentido N- a C-terminal en dicha proteína de fusión se selecciona del grupo consistente en A-B-C, A-C-B, B-A-C, B-C-A, C-A-B y C-B-A y/o en donde al menos una de las uniones entre las regiones A, B y C se establece a través de un enlazador peptídico.
- 15 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 en donde
- a. Apo A o la variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con Apo A es de origen humano o de origen murino,
- 20 b. IL15 o la variante funcionalmente equivalente de la misma que presenta, al menos, un 70% de identidad con IL15 es de origen humano o de origen murino y/o
- c. el polipéptido que comprende el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 o una variante funcionalmente equivalente del mismo que presenta, al menos, un 70% de identidad con el dominio Sushi de la cadena alfa del receptor de IL15 es de origen humano o de origen murino.
- 25 7. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Un vector o una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según la reivindicación 7, un vector según la reivindicación 8 o una construcción génica según la reivindicación 8.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según la reivindicación 7, un vector o una construcción génica según la reivindicación 8 o una célula huésped según la reivindicación 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. Método *in vitro* para promover la expansión de linfocitos T específicos de un antígeno que comprende poner en contacto una población de linfocitos previamente expuestos *in vivo* a dicho antígeno con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según la reivindicación 7, un vector o una construcción génica según la reivindicación 8 o una célula huésped según la reivindicación 9.
- 40

12. Método según la reivindicación 11 en donde los linfocitos se someten previamente a una activación *in vitro* mediante la puesta en contacto de los linfocitos con el antígeno al que han sido expuestos dichos linfocitos T.
- 5 13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según la reivindicación 7, un vector o una construcción génica según la reivindicación 8 o una célula huésped según la reivindicación 9 para su uso en medicina.
- 10 14. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, un polinucleótido según la reivindicación 7, un vector o una construcción génica según la reivindicación 8 o una célula huésped según la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad que requiere la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.
- 15 15. Una composición, proteína de fusión, polinucleótido, vector o construcción genética para su uso según la reivindicación 14 en donde la enfermedad que requiere la estimulación de la respuesta inmune se selecciona del grupo consistente en una enfermedad infecciosa y una enfermedad neoplásica, preferiblemente un tumor o una metástasis.

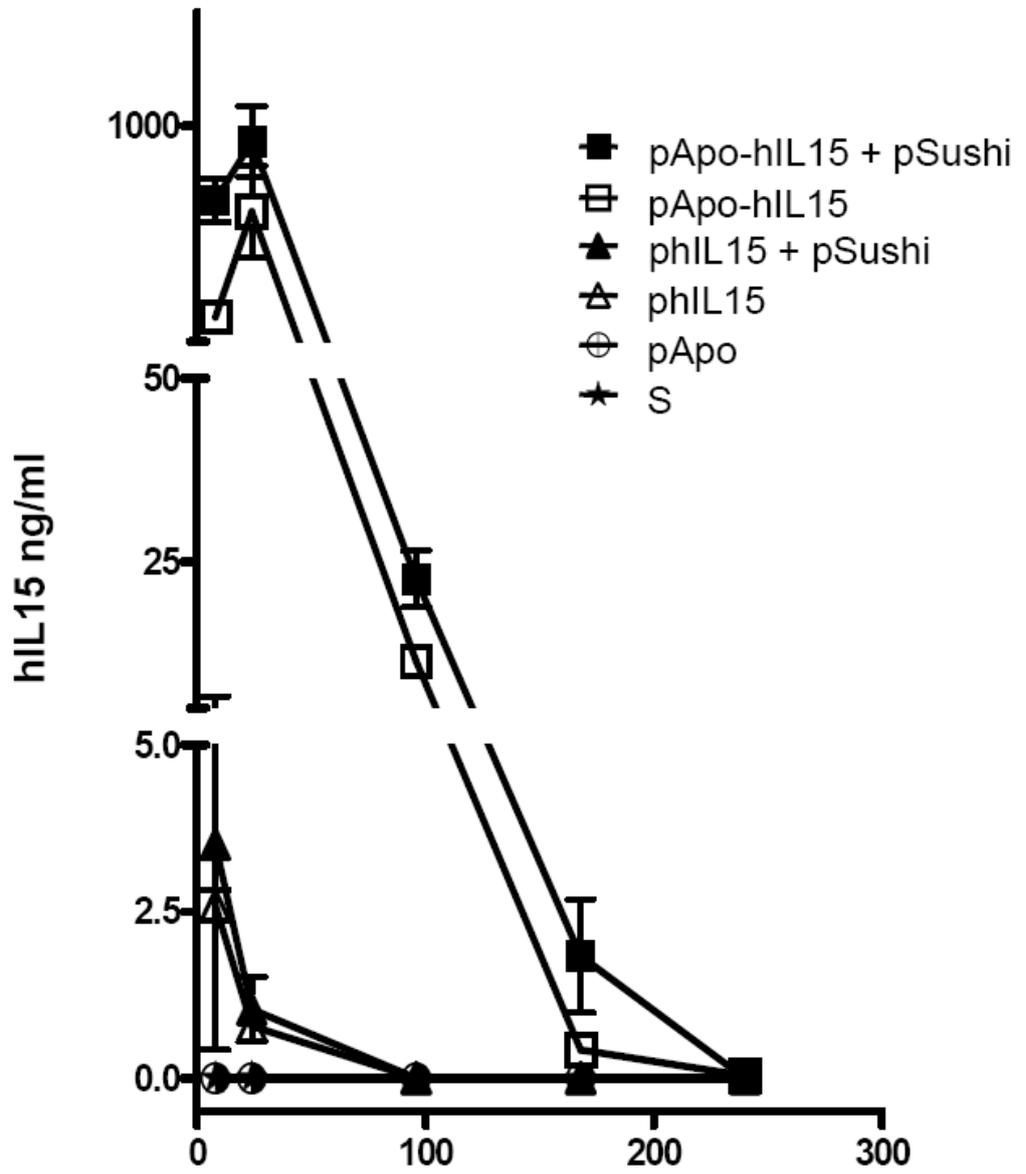


FIGURA 1

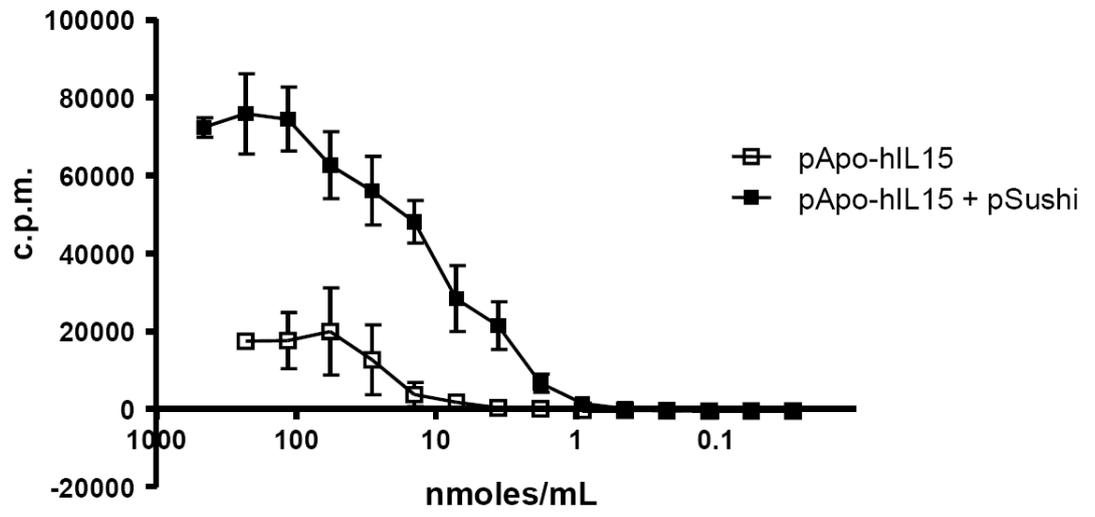


FIGURA 2

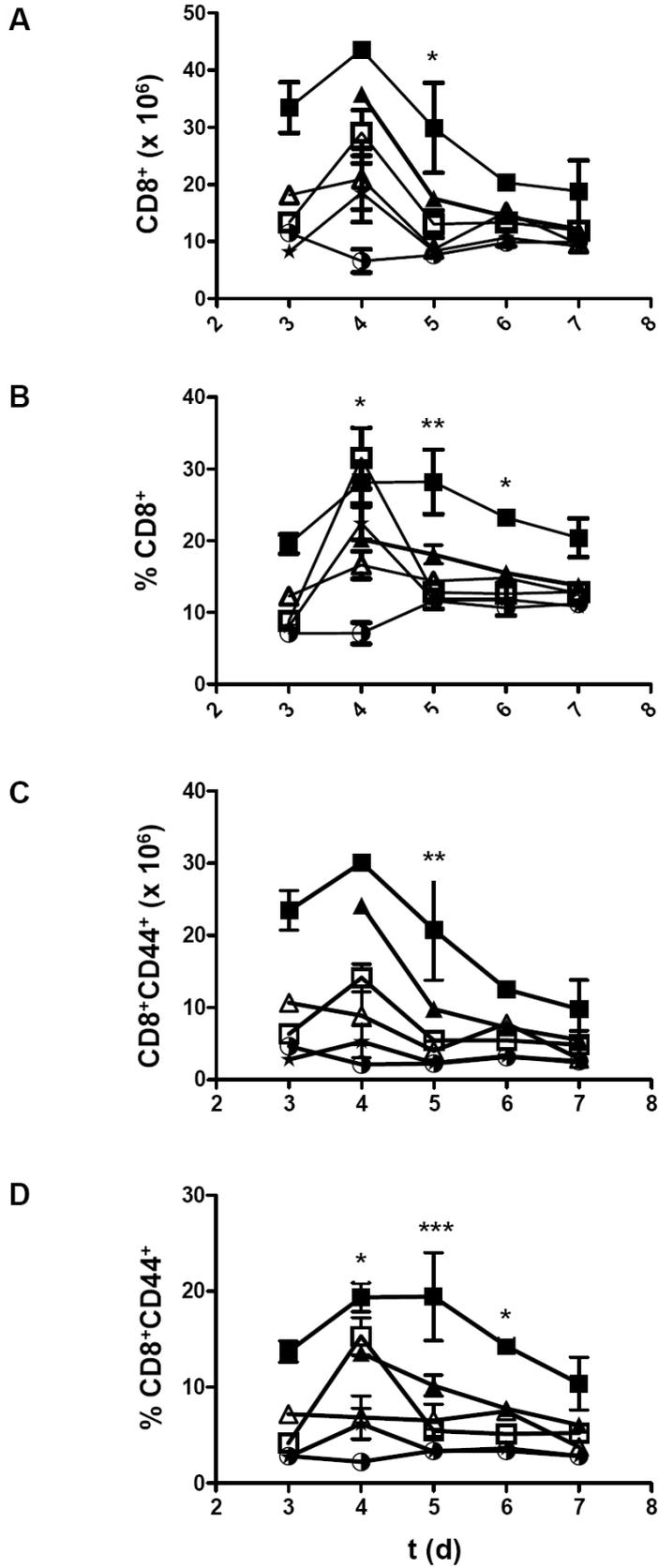


FIGURA 3

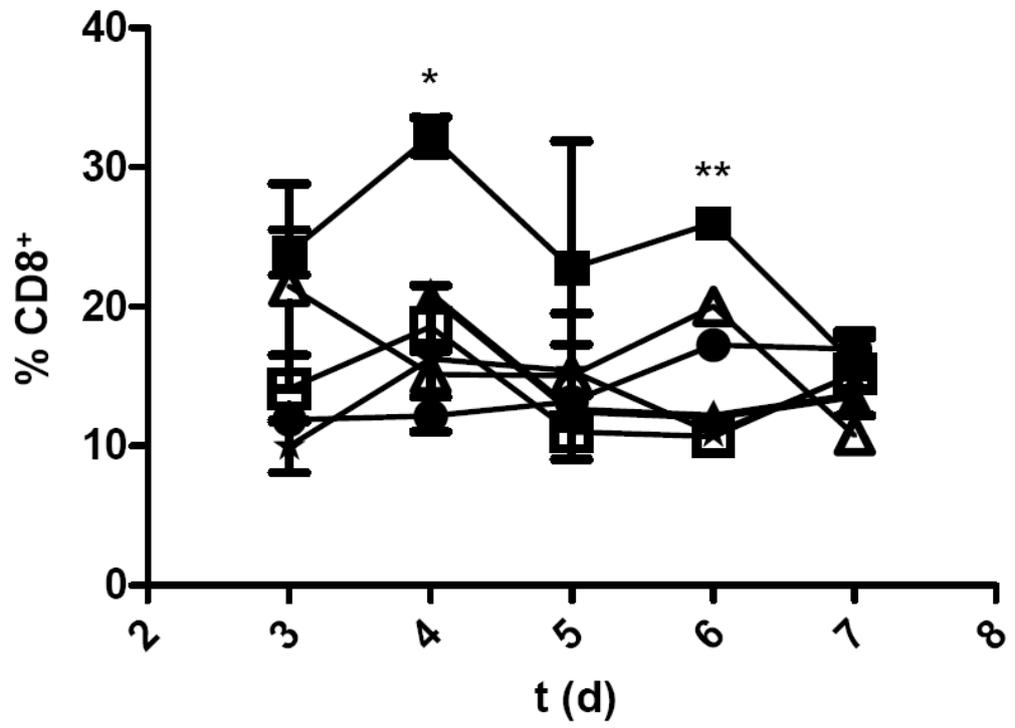


FIGURA 4

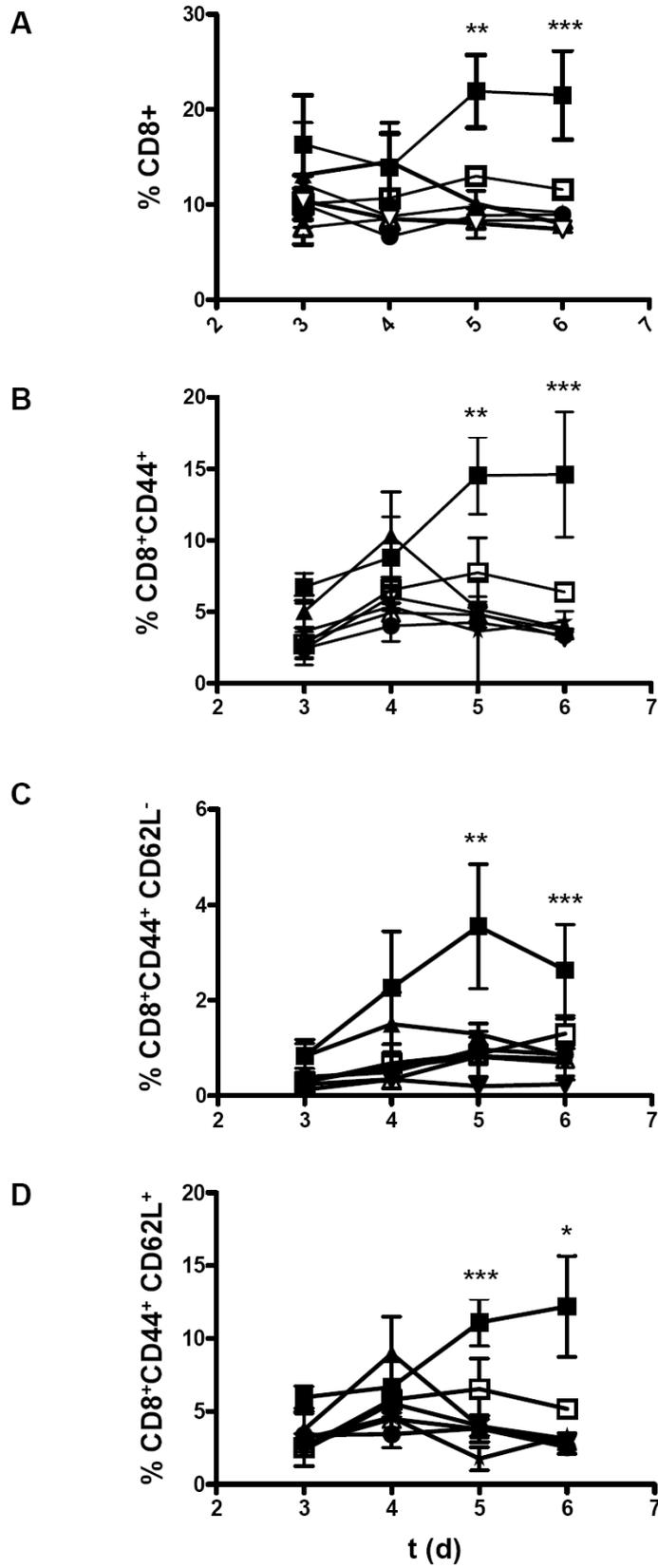


FIGURA 5

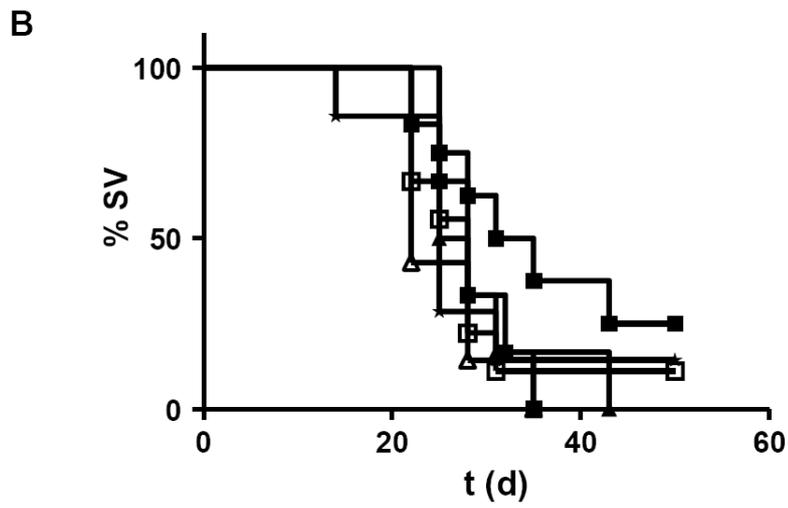
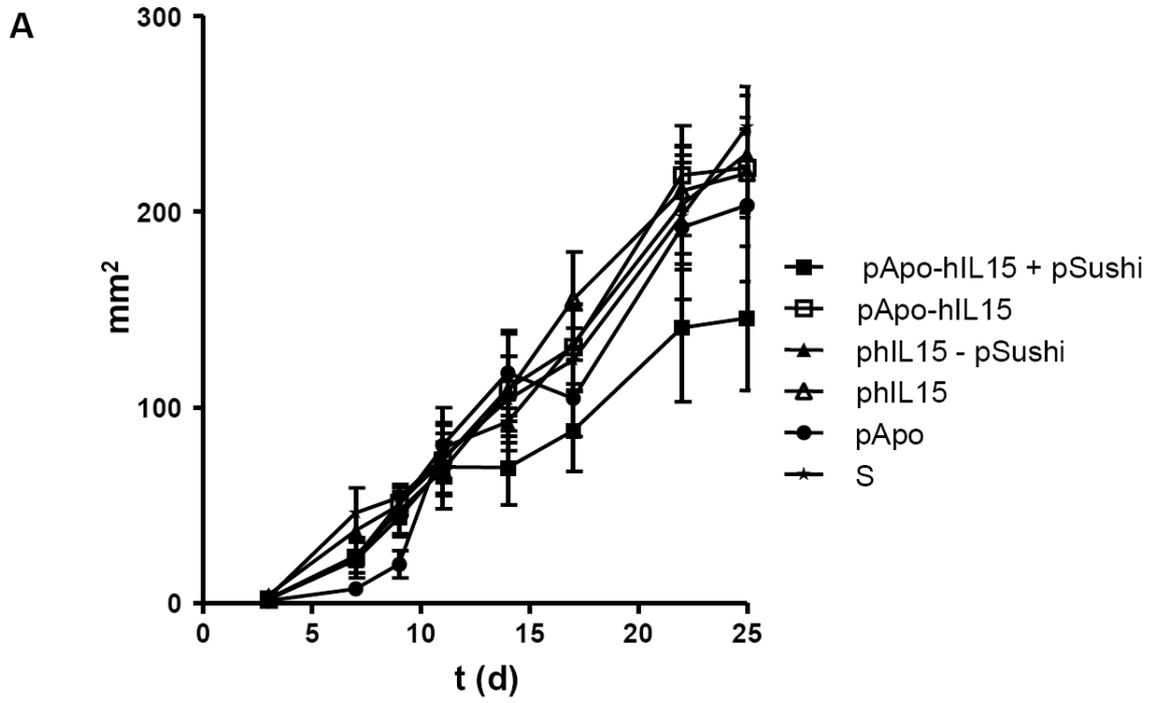
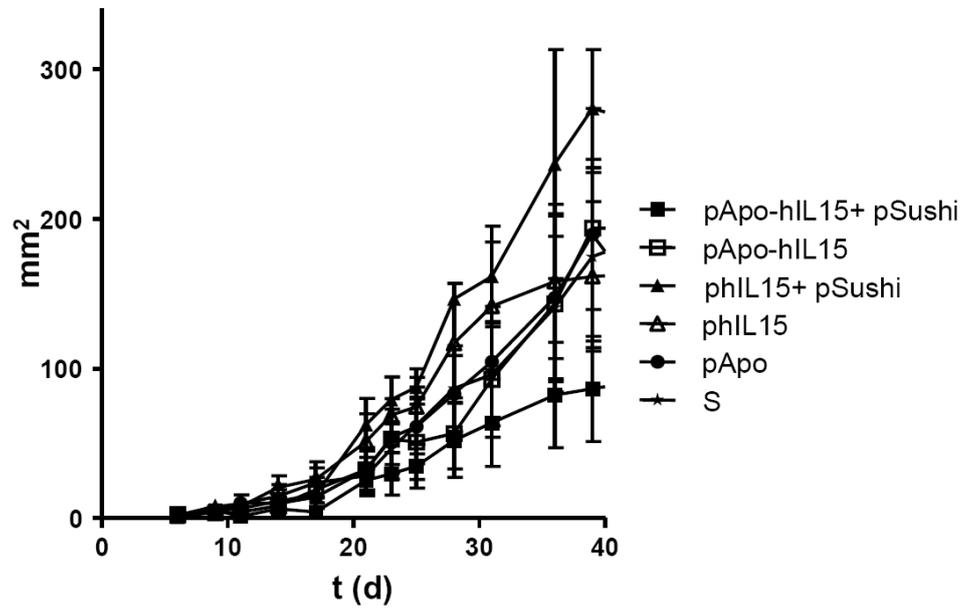


FIGURA 6

A



B

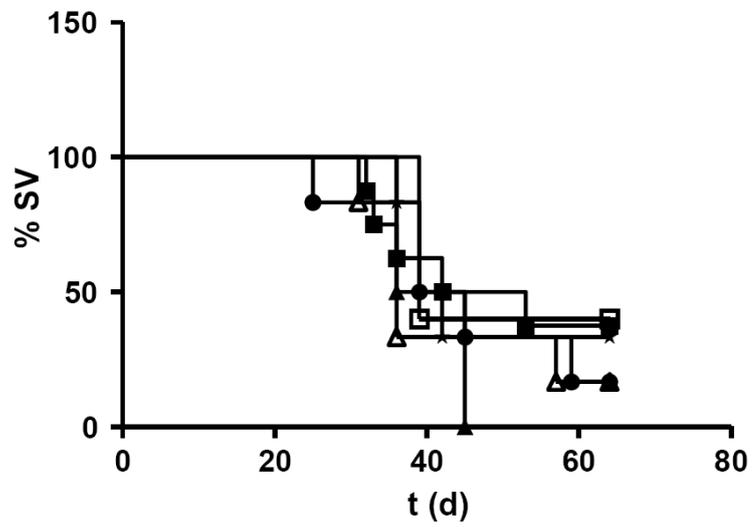


FIGURA 7

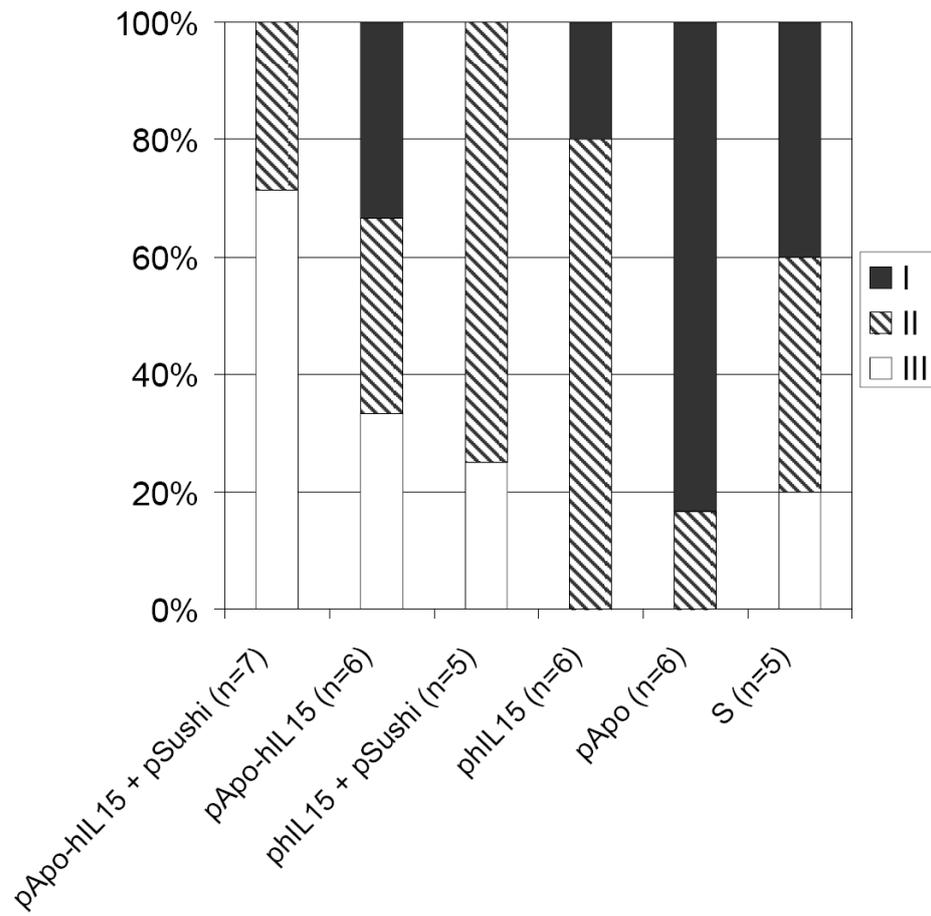


FIGURA 8

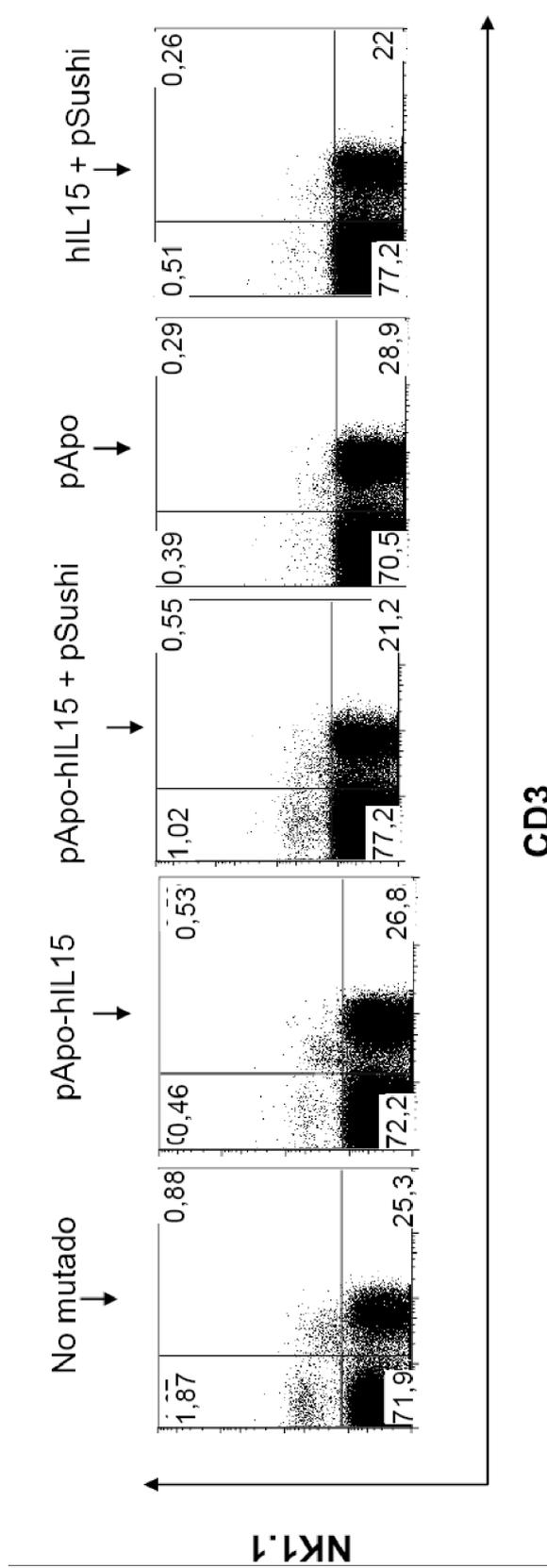


FIGURA 9A

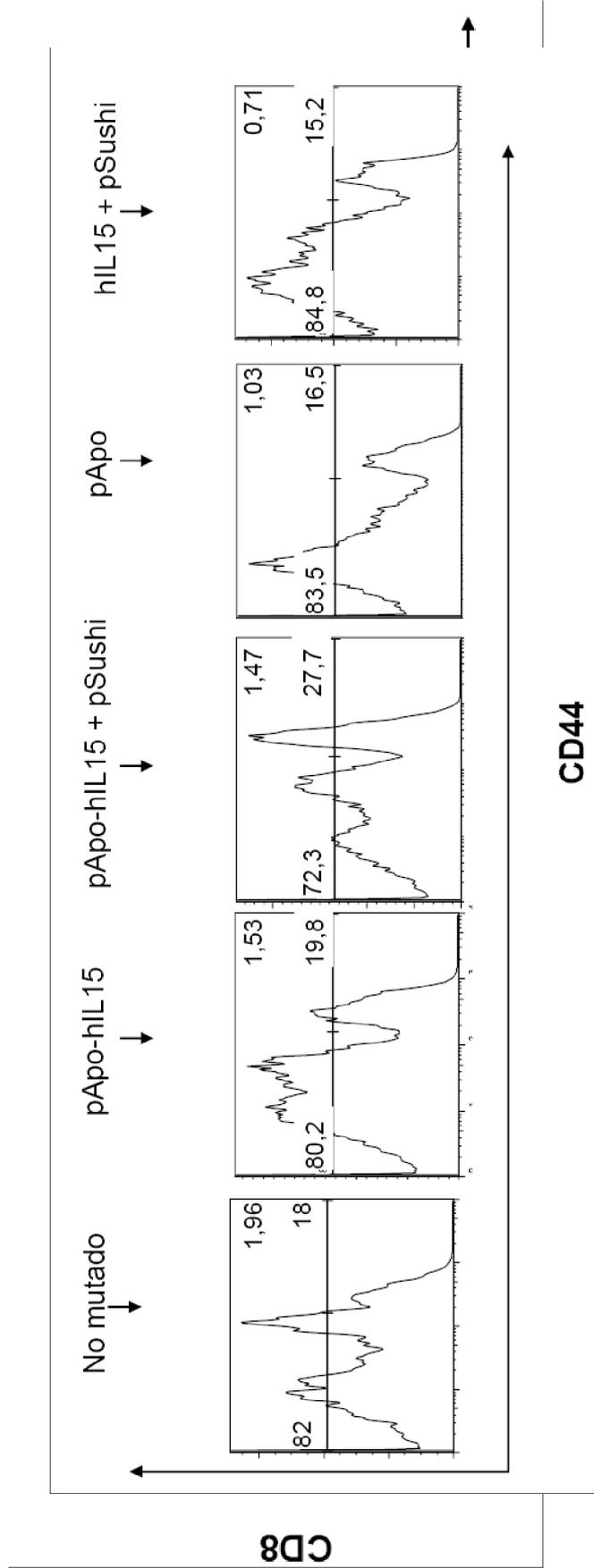


FIGURA 9B

FIGURA 9C

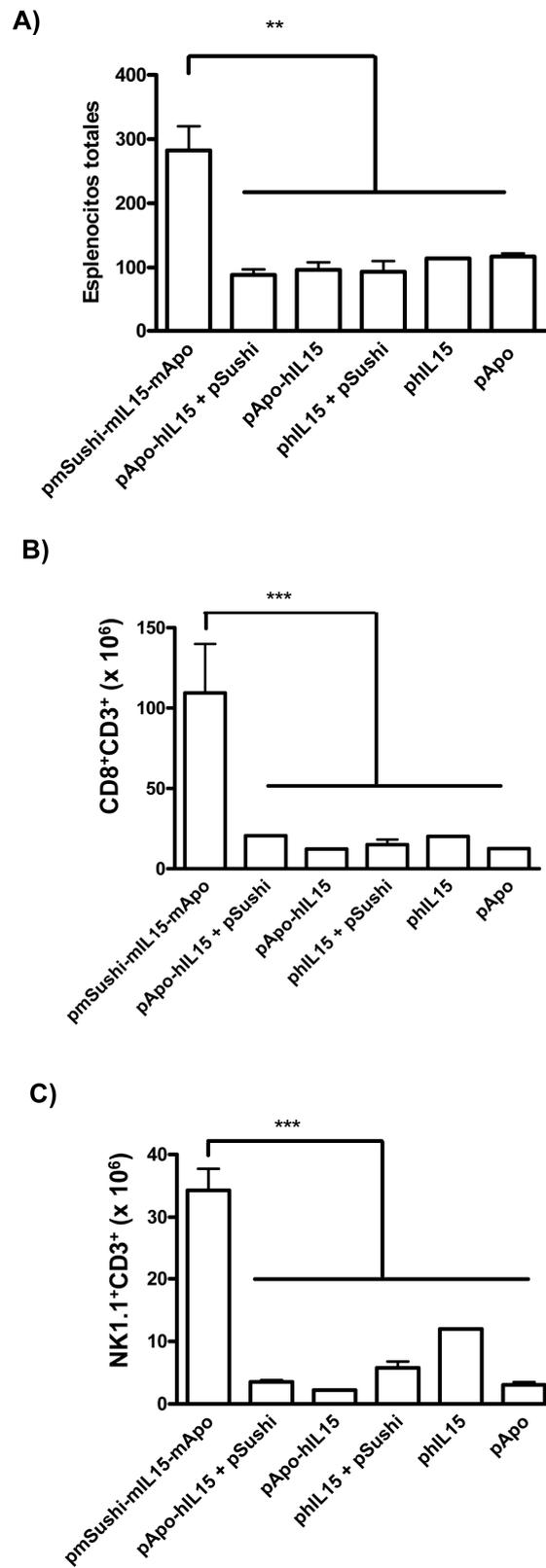


FIGURA 10

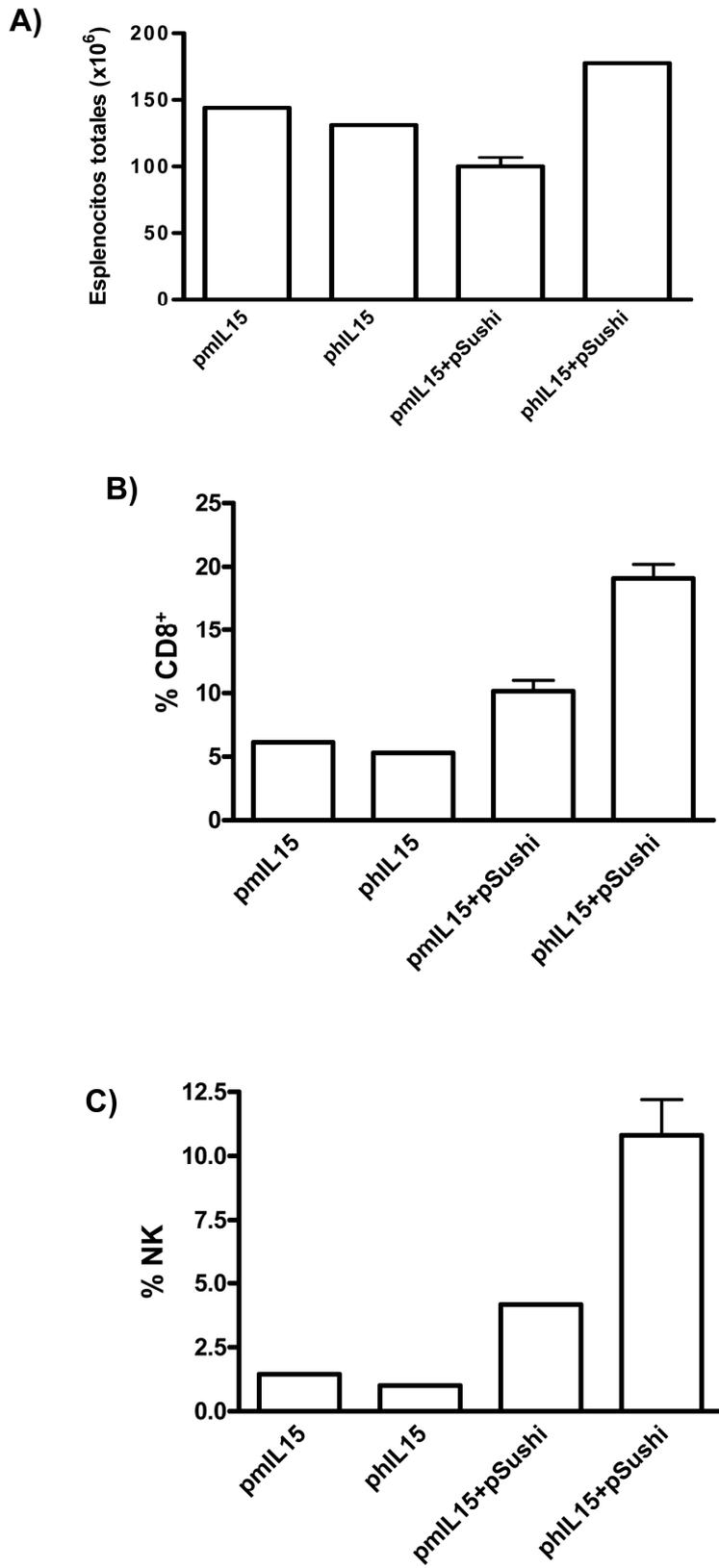


FIGURA 11

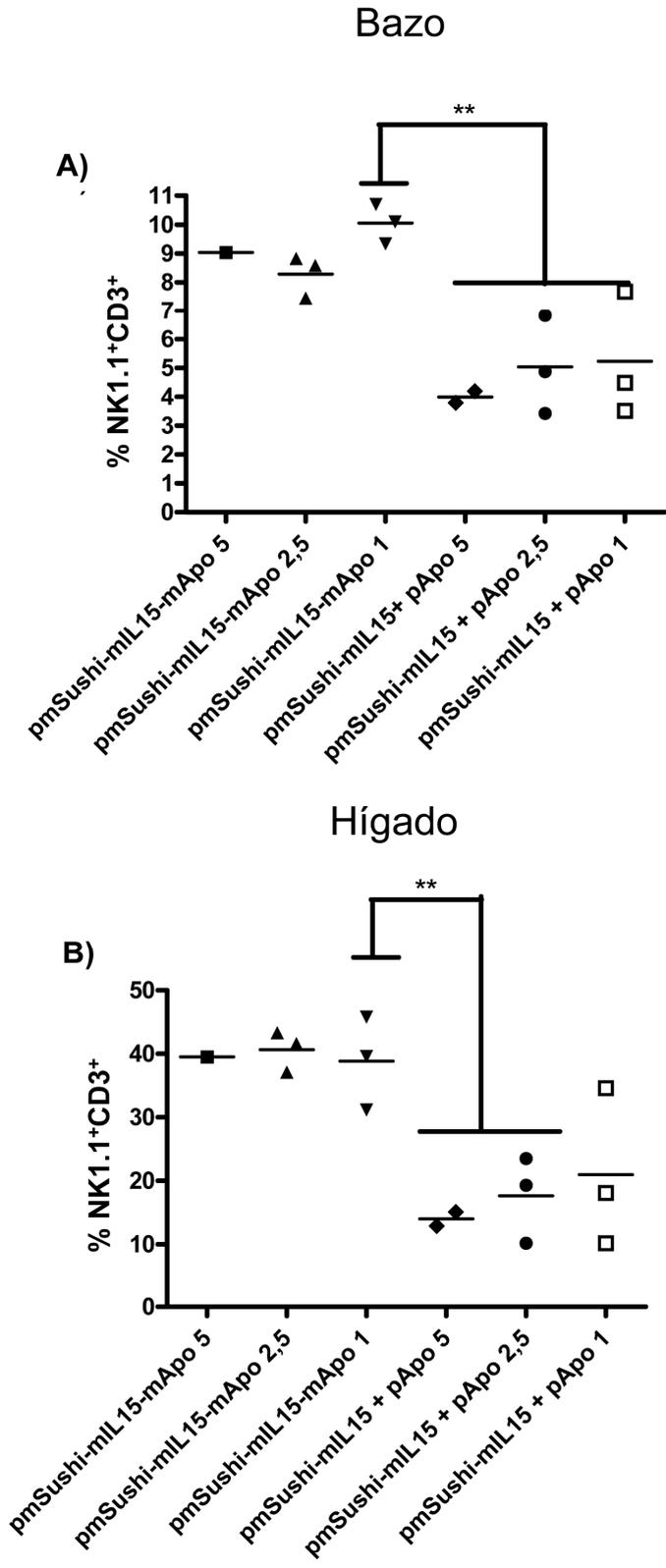


FIGURA 12

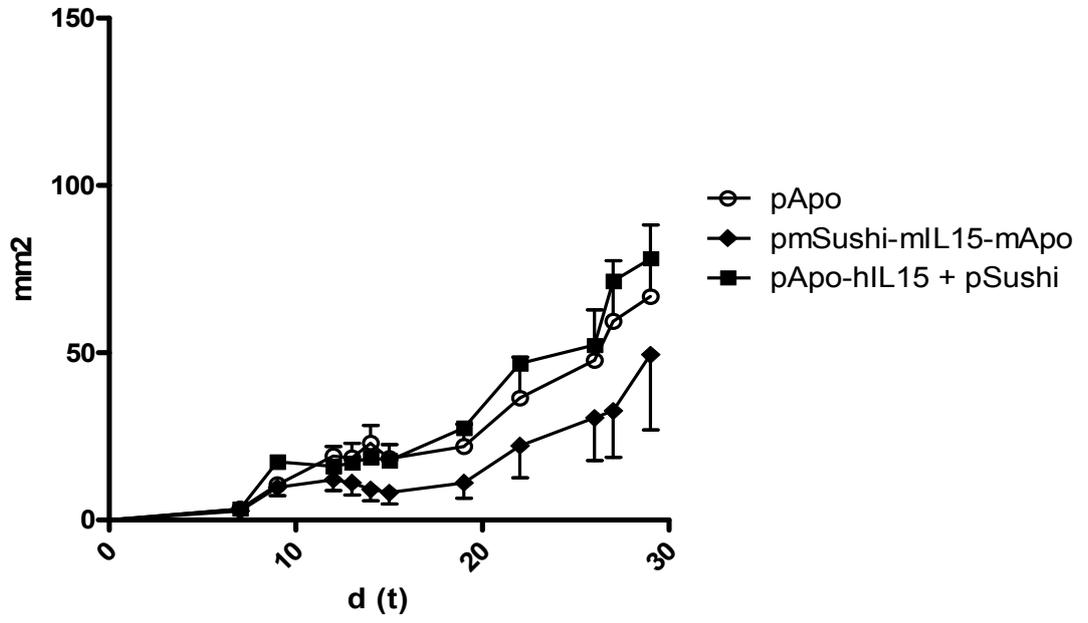


FIGURA 13