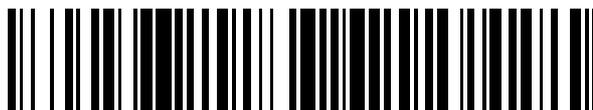


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 916**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008 E 08779855 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2173378**

54 Título: **Complejos de IL-15 e IL-15R alfa y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**27.06.2007 US 937471 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2014**

73 Titular/es:

**ADMUNE THERAPEUTICS LLC (50.0%)  
107 Water Street  
Danvers, MA 01923, US y  
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN  
SERVICES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PAVLAKIS, GEORGE N.;  
VOURNAKIS, JOHN N.;  
FELBER, BARBARA K. y  
FINKIELSZTEIN, SERGIO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 466 916 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Complejos de IL-15 e IL-15R alfa y usos de los mismos

**Intereses Gubernamentales**

5 Esta invención fue creada en el ejercicio de un acuerdo de investigación y desarrollo en colaboración con los Institutos Nacionales de Salud, una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a Agentes Terapéuticos que modulan la función mediada por IL-15 para la prevención, tratamiento y/o control de enfermedades que implican la señalización mediada por IL-15, tales como el cáncer. También se describen en la presente memoria Agentes Terapéuticos que modulan la función mediada por IL-15 para la prevención, tratamiento y/o control de enfermedades que implican la señalización mediada por IL-15 incluyendo, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, y rechazo de trasplantes.

**2. Antecedentes de la invención**

15 La citoquina, interleuquina-15 (IL-15), es un miembro de la familia de linfoquinas con cuatro haces de hélices alfa producidas por muchas células en el organismo. La IL-15 desempeña un papel fundamental en la modulación de la actividad del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo, p. ej., mantenimiento de la respuesta de células T de memoria a patógenos invasores, inhibición de la apoptosis, activación de las células dendríticas, e inducción de la proliferación y la actividad citotóxica de las células Asesinas Naturales "Natural Killer" (NK).

20 El receptor de IL-15 consiste en tres polipéptidos, el receptor alfa de IL-15 de tipo específico ("IL-15Ra"), el receptor beta de IL-2/IL-15 (o CD122) ("β"), y la cadena gamma común (o CD132) ("γ") que es compartida por múltiples receptores de citoquinas. Se cree que IL-15Ra es expresado por una amplia variedad de tipos de células, pero no necesariamente junto con β y γ. Se ha demostrado que la señalización de IL-15 se produce a través del complejo heterodimérico de IL-15Ra, β, y γ; a través del complejo heterodimérico de β y γ, o a través de una subunidad, IL-15RX, encontrada en mastocitos.

25 IL-15 es una proteína soluble, pero la IL-15 endógena no es fácilmente detectable en el suero o fluidos corporales - en lugar de eso, se produce predominantemente como una forma unida a la membrana que es expresada o adquirida por varios tipos de células accesorias. Por ejemplo, aunque el ARNm de IL-15 se detecta en las células de linaje tanto hematopoyético como no hematopoyético, las células T no producen IL-15. En lugar de eso, IL-15 se une a IL-15Ra, formando complejos en la superficie celular sobre las células T. La IL-15 se une específicamente a IL-15Ra con alta afinidad a través del "dominio sushi" en el exón 2 del dominio extracelular del receptor. Después del reciclaje trans-endosomal y la migración de vuelta a la superficie de la célula, estos complejos de IL-15 adquieren la propiedad de activar las células vecinas que expresan el complejo receptor de baja afinidad IL-15R βγ, induciendo la señalización mediada por IL-15 a través de la vía Jak/Stat. Se ha observado una forma soluble de origen natural de IL-15Ra ("sIL-15Ra"), que se escinde en un sitio de escisión en el dominio extracelular inmediatamente distal al dominio transmembrana del receptor. La enzima convertidora del factor-alfa de necrosis tumoral (TACE/ADAM17) ha sido implicada como una proteasa involucrada en este proceso.

30 Basándose en su papel de múltiples facetas en el sistema inmunológico, se han explorado diversas terapias diseñadas para modular la función mediada por IL-15. Por ejemplo, la administración de IL-15 exógena puede potenciar la función inmunológica de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De acuerdo con su actividad potenciadora inmunológica, se observa un aumento de la expresión de IL-15 endógena en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, y psoriasis. Debido a que algunos estudios informaron de que la forma soluble de IL-15Ra (sIL-15Ra) es un antagonista de la señalización mediada por IL-15, se ha explorado sIL-15Ra para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias. Sin embargo, informes recientes sugieren que la IL-15, cuando forma complejo con RIL-15Ra, o el dominio sushi, mantiene su función potenciadora inmunológica.

35 A pesar de la cantidad de avances realizados en la comprensión de la función de la IL-15, no está claro cómo se pueden utilizar las diversas formas de IL-15Ra, solo o cuando forma complejo con IL-15, para modular la función de IL-15 como parte de un régimen terapéutico.

40 La Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2006/165668 se refiere a métodos para la producción de células cancerosas que expresan una proteína terapéutica e indica que las células cancerosas pueden ser inactivadas por irradiación antes de administrar las células a un sujeto. Sato et al. PNAS 104 (2): 588-593 (2007) describen células 293T transfectadas con un constructo de expresión de IL-15Ra y la incubación de las mismas con IL-15 recombinante purificada que se añadió al cultivo. Ninguno de estos documentos describe o sugiere la invención reivindicada.

55

### 3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende células cancerosas humanas irradiadas diseñadas para expresar simultáneamente de forma recombinante IL-15 humana y receptor alfa de IL-15 humano ("IL-15Ra") para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano. La presente invención se refiere adicionalmente a un método para elaborar células cancerosas de humanas irradiadas que expresan recombinantemente IL-15 humana e IL-15Ra humano, en donde dicho método comprende las etapas de: (i) introducir una o más constructos de ácido nucleico que codifica IL-15 humana nativa recombinante o un derivado de la misma e IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo en células cancerosas humanas aisladas de un sujeto, en donde dicho derivado de IL-15 humana conserva la función de la IL-15 nativa para unirse a IL-15Ra, y en donde dicho derivado de IL-15Ra humano conserva la función del IL-15Ra nativo para unirse a IL-15; y (ii) irradiar dichas células cancerosas humanas. La presente invención también se refiere a una célula cancerosa humana irradiada que expresa recombinantemente la IL-15 humana nativa o un derivado de la misma e IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo producidos mediante el método de la presente invención. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula cancerosa humana irradiada de la presente invención.

En la presente memoria se describen agentes que modulan la transducción de la señal o la función de la interleuquina-15 ("IL-15") ("Agentes Terapéuticos") y el uso de esos agentes para modular la función inmunológica. Los Agentes Terapéuticos se dirigen a la interacción entre IL-15 y su receptor y modulan la transducción de la señal inducida por IL-15. Los Agentes Terapéuticos se pueden formular con polímeros, tales como poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto humano para modular la función inmunológica mediada por IL-15.

La presente invención proporciona Agentes Terapéuticos que inducen la transducción de la señal de IL-15 y la potenciación de la función inmunológica mediada por IL-15 (es decir, Agentes Terapéuticos Agonísticos). Los Agentes Terapéuticos Agonísticos son útiles para la potenciación de la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto que necesite tal terapia. En particular, los Agentes Terapéuticos Agonísticos son útiles para la prevención, tratamiento y/o control de trastornos en los que resulta beneficioso potenciar la función inmunológica mediada por IL-15. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos incluyen el cáncer y enfermedades infecciosas. En una realización específica, se proporciona en la presente memoria un Agente Terapéutico Agonístico para su uso en un método para el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto humano.

Los Agentes Terapéuticos Agonísticos incluyen complejos que se unen a las subunidades  $\beta\gamma$  del receptor de IL-15 y comprenden IL-15 unida covalentemente o no covalentemente al receptor alfa de interleuquina 15 ("IL-15Ra") ("complejos de IL-15/IL-15Ra"). El complejo de IL-15/IL-15Ra puede comprender IL-15 nativa o un derivado de IL-15 unido covalente o no covalentemente a IL-15Ra nativo o un derivado de IL-15Ra. En una realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende un derivado de IL-15Ra y el derivado de IL-15Ra es una forma soluble del IL-15Ra nativo. En otra realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende un derivado de IL-15Ra y el derivado de IL-15Ra comprende mutaciones que inhiben la escisión por una proteasa endógena. En una realización específica, el sitio de escisión de dominio extracelular de IL-15Ra es remplazado por un sitio de escisión que es reconocido específicamente por una proteasa heteróloga. En una realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que es escindido por una enzima de procesamiento endógeno es remplazado por un dominio heterólogo (p. ej., dominio transmembrana heterólogo) o una secuencia de aminoácido sintética que no permite la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En ciertas realizaciones, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que es escindido por una enzima de procesamiento endógena es mutado para inhibir la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En una realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra es remplazado por un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo (p. ej., dominio transmembrana heterólogo que es reconocido y escindido por otra enzima no relacionada con la enzima de procesamiento endógena que escinde IL-15Ra).

Además de IL-15 e IL-15Ra, los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden comprender una molécula heteróloga. La molécula heteróloga se puede conjugar con IL-15 y/o IL-15Ra. La molécula heteróloga se conjuga con IL-15 o IL-15Ra de una manera que no interfiera o evite que IL-15 e IL-15Ra se unan entre sí y que no interfiera o evite la interacción entre el complejo de IL-15/IL-15Ra y las subunidades  $\beta\gamma$  del receptor de IL-15. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar. Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos parasitarios, y antígenos tumorales. En otras realizaciones, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno celular (p. ej., un receptor) expresado por una célula que se desea elegir como diana. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga incrementa la estabilidad de la proteína. En ciertas realizaciones, la molécula heteróloga es un dominio Fc de una inmunoglobulina o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento del mismo.

Los complejos de IL-15/IL-15Ra se pueden formular para su administración a un sujeto humano para potenciar la función inmunológica mediada por IL-15. En una realización específica, los complejos de IL-15/IL-15Ra se formulan con un polímero, tal como poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 1-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto (preferiblemente, un

sujeto humano). Los complejos de IL-15/IL-15Ra también se pueden administrar a un sujeto no humano para usos veterinarios y/o para producir anticuerpos que se unen específicamente a los complejos de IL-15/IL-15Ra.

En realizaciones específicas, se incluye en la presente memoria, un método para potenciar la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesite una composición que comprende una cantidad eficaz de un complejo de IL-15/IL-15Ra formulado con un polímero de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, en donde el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana o un derivado de la misma ligado de forma covalente o no covalente a IL-15Ra o un derivado del mismo. En una realización adicional, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana e IL-15Ra humano. En otra realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana y un derivado de IL-15Ra humano. En otra realización más, el IL-15Ra humano o el derivado de IL-15Ra humano son solubles. En una realización concreta, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto humano uno o más de otros polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, citoquinas o factores de crecimiento) o terapia.

Los Agentes Terapéuticos Agonísticos también incluyen ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra que cuando son expresados producen complejos de IL-15/IL-15Ra y células diseñadas para expresar de forma recombinante los complejos de IL-15/IL-15Ra introduciendo ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra en las células. Los ácidos nucleicos se pueden administrar a un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano), como parte de un protocolo de terapia génica. En una realización específica, los ácidos nucleicos están formulados con un polímero, tal como poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano). Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden transfectar (en una realización específica, transfectar de forma estable) a las células para producir grandes cantidades de complejo IL-15/IL-15Ra adecuadas para usos *in vitro* y/o *in vivo*. Según se describe en la presente memoria, las células modificadas genéticamente para expresar los ácidos nucleicos son líneas celulares. En otra realización, las células modificadas genéticamente para expresar los ácidos nucleicos son células primarias de un sujeto humano. En una realización específica, las células modificadas genéticamente para expresar los ácidos nucleicos son células cancerosas humanas.

Se pueden utilizar células modificadas genéticamente para expresar IL-15 e IL-15Ra para generar grandes cantidades de complejo de IL-15/IL-15Ra adecuadas para usos *in vitro* e *in vivo*. Las células modificadas genéticamente para expresar IL-15 e IL-15Ra también se pueden administrar a un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano), como parte de un protocolo de terapia génica. En una realización específica, se administran células cancerosas humanas irradiadas modificadas genéticamente para expresar IL-15 e IL-15Ra a un paciente de cáncer. En una realización concreta, las células modificadas genéticamente para expresar complejos de IL-15/IL-15Ra se formulan para la administración a un sujeto humano para potenciar la función inmunológica mediada por IL-15. En otra realización, las células modificadas genéticamente para expresar complejos de IL-15/IL-15Ra se formulan con un polímero, tal como poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina, para la administración a un sujeto (preferiblemente, un sujeto humano). La presente invención también se refiere a una célula cancerosa humana irradiada que expresa de forma recombinante IL-15 humana e IL-15Ra humano producidos por un método descrito en la presente memoria, y una composición farmacéutica que comprende una célula cancerosa irradiada descrita en la presente memoria. En una realización concreta, la composición farmacéutica comprende una célula cancerosa irradiada formulada con un polímero de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la elaboración de células cancerosas irradiadas que expresan de forma recombinante IL-15 humana e IL-15Ra humano, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir uno o varios constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 humana recombinante o un derivado de la misma e IL-15Ra humano o un derivado del mismo; y (ii) irradiar dichas células cancerosas. En una realización concreta, el IL-15Ra humano o el derivado de IL-15Ra humano son solubles.

En realizaciones específicas, se proporciona en la presente memoria una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero (p. ej., IL-15 humana) o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero (p. ej., IL-15Ra humano) o un derivado del mismo, en donde la célula expresa al menos 0,6 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones concretas la célula que expresa al menos 0,6 pg de IL-15 de mamífero (p. ej., IL-15 humana) o un derivado de la misma crece en medio libre de suero.

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, comprendiendo la composición células cancerosas irradiadas modificadas genéticamente para expresar simultáneamente de forma recombinante (i) IL-15 humana o un derivado de la misma, y (ii) la IL-15Ra humano o un derivado del mismo. Según se describe en la presente memoria, las células cancerosas se obtienen mediante el aislamiento de las células cancerosas del sujeto. En una realización adicional, las células cancerosas irradiadas (p. ej., células cancerosas humanas) se obtienen manipulando genéticamente células cancerosas para expresar simultáneamente de forma recombinante IL-15 humana o un derivado de la misma e IL-15Ra humano o un derivado del mismo (antes de la irradiación). En otra realización, las células cancerosas irradiadas (p. ej., células cancerosas humanas) se obtienen manipulando genéticamente células cancerosas para expresar simultáneamente de forma recombinante IL-15 humana y un derivado de IL-15Ra humano (antes de la irradiación). En otra realización más, el IL-15Ra humano o el derivado de IL-15Ra humano son solubles. En una cierta realización, las células cancerosas irradiadas expresan recombinantemente además uno o más polipéptidos terapéuticos (p. ej., citoquinas o factores de crecimiento).

Se describen en la presente memoria Agentes Terapéuticos que reducen o inhiben la transducción de la señal de IL-15 y suprimen la función inmunológica mediada por IL-15 (es decir, "Agentes Terapéuticos Antagónicos"). Los Agentes Terapéuticos Antagónicos incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un complejo de IL-15/IL-15Ra y evitan que los complejos de IL-15/IL-15Ra endógenos se unan a las subunidades  $\beta\gamma$  del receptor de IL-15, y células modificadas genéticamente para expresar tales anticuerpos. Los Agentes Terapéuticos Antagónicos son útiles para la supresión de la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto que necesite tal terapia. En particular, los Agentes Terapéuticos Antagónicos son útiles para la prevención, tratamiento y/o control de trastornos en los que es beneficioso suprimir la función inmunológica mediada por IL-15. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos incluyen trastornos autoinmunitarios, enfermedad de injerto contra anfitrión, rechazo de trasplantes, y trastornos inflamatorios. En una realización específica, se proporciona en la presente memoria un método para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o un trastorno inflamatorio en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a complejos de IL-15/IL-15Ra endógenos. En una realización adicional, el anticuerpo se une específicamente a complejos de IL-15/IL-15Ra endógenos y no se une específicamente a IL-15 sola o a IL-15Ra solo cuando forman complejos entre sí. En realizaciones específicas, se proporciona en la presente memoria un método para tratar un trastorno autoinmunitario o trastorno inflamatorio en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a complejos de IL-15/IL-15Ra y reduce la unión de los complejos de IL-15/IL-15Ra al complejo receptor beta-gamma tal como se determina en cultivo celular o *in vitro*. En una realización adicional del método, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

### 3.1. Terminología

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "alrededor de" y "aproximadamente", cuando se utilizan para modificar un valor numérico o un intervalo numérico, indican que las desviaciones razonables del valor o el intervalo, típicamente 5% o 10% por encima y 5% o 10% por debajo del valor o intervalo, se mantienen dentro del significado previsto del valor o intervalo citados.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno, p. ej., inmunoglobulinas. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos a disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotipo (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id contra anticuerpos), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. En concreto, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Ig1 e IgA2) o subclase.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "enfermedad" y "trastorno" se utilizan indistintamente para referirse a una afección, en particular, una afección patológica, y más concretamente una enfermedad afectada por la transducción de la señal de IL-15.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "se une inmuno-específicamente", "reconoce inmuno-específicamente", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos en el contexto de los anticuerpos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (p. ej., epítipo o complejo inmunitario) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno se puede unir a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad como se determina, p. ej., mediante inmunoanálisis, BIAcore, u otros análisis conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no presentan reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoanálisis, BIAcore, u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos en el contexto de la interacción entre el receptor (p. ej., IL-15Ra nativo) y el ligando (p. ej., IL-15 nativa) se refiere a la unión o asociación específicas entre el ligando y el receptor. Preferiblemente, el ligando tiene una mayor afinidad por el receptor que por otras moléculas. En una realización específica, el ligando es IL-15 nativa y el receptor nativo es IL-15Ra. En otra realización específica, el ligando es el complejo de IL-15 nativa/IL-15Ra y el receptor nativo es el complejo receptor  $\beta\gamma$ . En una realización adicional, el complejo de IL-15/IL-15Ra se une al complejo receptor  $\beta\gamma$  y activa la transducción de la señal mediada por IL-15. Se pueden identificar los ligandos que se unen específicamente al receptor, por ejemplo, mediante inmunoanálisis, BIAcore, u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15 nativa" e "interleuquina-15 nativa" en el contexto de las proteínas o los polipéptidos hacen referencia a cualquier secuencia de aminoácidos de interleuquina-15 de mamíferos de origen natural, incluyendo las formas inmadura o precursora y madura. Los ejemplos no limitantes de los Núms. de Acceso GeneBank para la secuencia de aminoácidos de diversas especies de interleuquina-15 de

## ES 2 466 916 T3

mamífero nativa incluyen NP\_000576 (humana, forma inmadura), CAA62616 (humana, forma inmadura), NP\_001009207 (*Felis catus*, forma inmadura), AAB94536 (*rattus*, forma inmadura), AAB41697 (*rattus*, forma inmadura), NP\_032383 (*Mus musculus*, forma inmadura), AAR19080 (canina), AAB60398 (*Macaca mulatta*, forma inmadura), AAI00964 (humana, forma inmadura), AAH23698 (*Mus musculus*, forma inmadura), y AAH18149 (humana). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa, que comprende el péptido señal largo (subrayado) y la IL-15 nativa humana madura (en cursiva):

MRISKPHLRSISIOCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIE  
DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSS

NGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTS (SEQ ID NO:1). En algunas realizaciones, la IL-15 nativa es la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, la IL-15 nativa es la forma madura de una IL-15 de mamífero de origen natural. En una realización específica, la IL-15 nativa es la forma precursora de IL-15 humana de origen natural. En otra realización, la IL-15 nativa es la forma madura de IL-15 humana de origen natural. En una realización, se aísla o purifica la proteína/polipéptido de IL-15 nativa.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15 nativa" e "interleuquina-15 nativa" en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la interleuquina-15 de mamífero, incluyendo las formas inmadura o precursora y madura. Los ejemplos no limitantes de los Núms. de Acceso GeneBank para la secuencia de nucleótidos de diversas especies de IL-15 de mamífero nativa incluyen NM\_000585 (humana), NM\_008357 (*Mus musculus*), y RNU69272 (*Rattus norvegicus*). Se proporciona la secuencia de nucleótidos que codifica la forma Inmadura/precursora de IL-15 humana nativa, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal largo (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica la IL-15 nativa humana madura (en cursiva): atgagaat ttcgaaacca catttgagaa gtattccat ccagtgctac ttgtgttac ttctaaacag tcattttcta actgaagctg qcattcatgt cttcattttg ggctgtttca qtgcagggct tctaaaaca gaagccaact gggigaagt aataagtgat ttgaaaaaa ttgaagatct tattcaatct atgcatttg atgctactt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca gcaatgaagt gctttctct ggagtaca gttattcac ttgagtcgg agatgcaagt atcatgata cagttagaaa tctgatcatc ctagcaaca acagttgtc tctaatggg aatgtaacag aatctggatg caaagaagt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa ttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcaca acacttcttg a (SEQ ID NO: 2). En una realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos codifican la forma inmadura o precursora de una IL-15 de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos codifican la forma madura de una IL-15 de mamífero de origen natural. En una realización específica, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 nativa codifican la forma precursora de la IL-15 humana de origen natural. En otra realización, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 nativa codifican la forma madura de la IL-15 humana de origen natural.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "derivado de IL-15" y "derivado de interleuquina-15" en el contexto de las proteínas o polipéptidos hacen referencia a: (a) un polipéptido que es idéntico en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% al polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (d) un polipéptido codificado por ácidos nucleicos puede hibridar en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica con los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos; o (f) un fragmento de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa. Los derivados de IL-15 también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura de origen natural de, un polipéptido de IL-15 de mamífero y una secuencia de aminoácidos de un péptido señal heterólogo. En una realización específica, un derivado de IL-15 es un derivado de un polipéptido de IL-15 humana nativa. En otra realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma inmadura o precursora de un polipéptido de IL-15 humana de origen natural. En otra realización, un derivado de IL-15 es un derivado de una forma madura de un polipéptido de IL-15 humana de origen natural. En una realización, se aísla o purifica un derivado de IL-15.

En una realización preferida, los derivados de IL-15 conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 de mamífero nativa para unirse a un polipéptido IL-15Ra, según se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, Biacore, co-inmunoprecipitación. En otra realización preferida, los derivados de IL-15 conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función del polipéptido de IL-15 de mamífero nativa para inducir la transducción de la señal mediada por IL-15, según se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de desplazamiento por electromovilidad, ELISA y otros inmunoanálisis.

El porcentaje de identidad se puede determinar utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. En una realización específica, el porcentaje de identidad se determina utilizando el programa "Best Fit" o "Gap" del Paquete de Programas de Análisis de Secuencia (Versión 10; Genetics Computer Group, Inc., University of

Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin). Se ha descrito la información referente a las condiciones de hibridación (p. ej., condiciones de rigurosidad alta, moderada, y típica), véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. US 2005/0048549 (p. ej., párrafos 72-73).

5 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "derivado de IL-15" y "derivado de interleuquina-15" en el contexto de los ácidos nucleicos hace referencia a: (a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es idéntico en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-15 de mamífero nativa; (c) una secuencia de ácido nucleico que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de bases de ácidos nucleicos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (d) una secuencia de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de rigurosidad alta, moderada o típica con una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; (e) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, moderada o típica con un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero; y (f) una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 de mamífero. En una realización específica, un derivado de IL-15 en el contexto de ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido de IL-15 humana. En otra realización, un derivado de IL-15 en el contexto de los ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica una forma inmadura o precursora de un polipéptido de IL-15 humana. En otra realización, un derivado de IL-15 en el contexto de los ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica una forma madura de un polipéptido de IL-15 humana.

15 Las secuencias de ácido nucleico del derivado de IL-15 incluyen secuencias de ácidos nucleicos de codón optimizado que codifican un polipéptido IL-15 de mamífero nativo, incluyendo formas maduras e inmaduras del polipéptido IL-15. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos del derivado de IL-15 incluyen ácidos nucleicos que codifican transcritos de ARN de IL-15 de mamífero que contienen mutaciones que eliminan sitios de empalme y elementos de inestabilidad (p. ej., elementos ricos en A/T o A/U) potenciales sin afectar a la secuencia de aminoácidos para aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15 de mamífero.

20 En una realización preferida, la secuencias de ácido nucleico derivadas de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo para unirse a IL-15Ra, medida mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, Biacore, co-inmunoprecipitación. En otra realización preferida, secuencias de ácido nucleico del derivado de IL-15 codifican proteínas o polipéptidos que conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo para inducir la transducción de la señal mediada por IL-15, medida mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., Análisis de desplazamiento por electromovilidad, ELISA y otros inmunoanálisis.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15" e "interleuquina-15" se refieren a una IL-15 nativa, un derivado de IL-15, o una IL-15 nativa y un derivado de IL-15.

40 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15Ra nativo" r "receptor alfa de interleuquina-15 nativo" en el contexto de proteínas o polipéptidos se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos del receptor alfa de interleuquina 15 ("IL-15 Ra") de mamífero de origen natural, incluyendo formas inmaduras o precursoras y maduras e isoformas de origen natural. Los ejemplos no limitantes de los números de acceso GenBank de la secuencia de aminoácidos de varios IL-15Ra de mamífero nativos incluyen NP\_002180 (humano), ABK41438 (Macaca mulatta), NP\_032384 (Mus musculus), Q60819 (Mus musculus), CAI41082 (humano). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura del IL-15Ra humano completo nativo, que comprende el péptido señal (subrayado) y el IL-15Ra nativo humano maduro (en cursiva): MAPRRARGCR TLGLPALLLL LLLRPPATRG *ITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIRDPALV HQRPAAPPSTV TTAGVTPQPE SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAAIVPGS QLMPKSPST GTTEISSHES SHGTPSQTTA KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTTVAIST STVLLCGLSA VLLACYLKS RQTPPLASVE MEAMEALPVT WGTSSRDEDL ENCSHHL* (SEQ ID NO: 3). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la forma inmadura de IL-15Ra humano soluble nativo, que comprende el péptido señal (subrayado) y el IL-15Ra nativo humano maduro (en cursiva): MAPRRARGCR TLGLPALLLL LLLRPPATRG *ITCPPMSVE HADIWVKSYS LYSRERYICN SGFKRKAGTS SLTECVLNKA TNVAHWTTPS LKCIRDPALV HQRPAAPPSTV TTAGVTPQPE SLSPSGKEPA ASSPSSNNTA ATTAAIVPGS QLMPKSPST GTTEISSHES SHGTPSQTTA KNWELTASAS HQPPGVYPQG HSDTT* (SEC ID NO: 4). En algunas realizaciones, el IL-15Ra nativo es la forma inmadura de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, el IL-15Ra nativo es la forma madura de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En ciertas realizaciones, el IL-15Ra nativo es una forma soluble de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, el IL-15Ra nativo es la forma completa de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En una realización específica, el IL-15Ra nativo es la forma inmadura de un polipéptido IL-15Ra humana de origen natural. En otra realización, el IL-15Ra nativo es la forma madura de un polipéptido IL-15Ra humano de origen natural. En ciertas realizaciones, el IL-15Ra

nativo es la forma soluble de un polipéptido IL-15Ra humano de origen natural. En otras realizaciones, el IL-15Ra nativo es la forma completa de un polipéptido IL-15Ra humano de origen natural. En una realización, una proteína o polipéptido de IL-15Ra nativo están aislados o purificados.

5 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15Ra nativo" y "receptor alfa de interleuquina-15 nativo" en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a cualquier secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica el receptor alfa de interleuquina-15 de mamífero, incluyendo las formas inmadura o precursora y madura. Los ejemplos no limitantes de los números de acceso Genbank de la secuencia de nucleótidos de varias especies de IL-15Ra de mamífero nativo incluyen NM\_002189 (humana), EF033114 (Macaca mulatta), y NM\_008358 (Mus musculus). Se proporciona la secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura de IL-15Ra humano nativo, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica IL-15Ra nativo humano maduro (en cursiva): atggcccc gcgcgggcg cgcggtgcc ggaccctcgg tctccggcg  
 10 ctgctactgc tgctgctgt ccggccggcg gcgacgcggg gc atcacgtg ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gctgtactc caggagcgg tacatttga actctggtt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac ggagtcgtg ttgaacaagg ccacgaatg  
 15 cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca cctccacag taacgacggc aggggtgacc ccacagccag agagcctc ccctctgga aaagagccc gacttcac tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtccgggct cccagctgat gcctcaaaa tcacctcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg caccocctc  
 20 cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgct cccaccagcc gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt cctgctgtg gggctgagcg ctgtgtct cctggcatg tacctcaagt caaggcaaac tccccgctg gccagcgttg  
 25 aatggaagc catggaggct ctgccgtga ctgggggac cagcagcaga gatgaagct tggaaaactg ctctaccac ctatga (SEW ID NO: 5). Se proporciona a secuencia de nucleótidos que codifica la forma inmadura de la proteína o polipéptido IL-15Ra humano soluble nativo, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (subrayado) y la secuencia de nucleótidos que codifica el IL-15Ra nativo soluble humano maduro (en cursiva): atggcccc gcgcgggcg  
 30 cgcggtgcc ggaccctcgg tctccggcg ctgctactgc tgctgctgt ccggccggcg gcgacgcggg gc atcacgtg ccctcccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gctgtactc caggagcgg tacatttga actctggtt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac ggagtcgtg ttgaacaagg ccacgaatg cgcccactgg acaaccccca gtctcaaatg cattagagac cctgccctgg ttcaccaaag gccagcgcca cctccacag taacgacggc aggggtgacc ccacagccag agagcctc ccctctgga aaagagccc gacttcac tcccagctca aacaacacag cggccacaac agcagctatt gtccgggct cccagctgat gcctcaaaa tcacctcca caggaaccac agagataagc agtcatgagt cctcccacgg caccocctc  
 35 cagacaacag ccaagaactg ggaactcaca gcatccgct cccaccagcc gccaggtgtg tatccacagg gccacagcga caccactgtg gctatctcca cgtccactgt cctgctgtg gggctgagcg ctgtgtct cctggcatg tacctcaagt caaggcaaac tccccgctg gccagcgttg  
 40 aatggaagc catggaggct ctgccgtga ctgggggac cagcagcaga gatgaagct tggaaaactg ctctaccac ctatga (SEQ ID NO: 6). En una realización específica, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado o purificado. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma inmadura de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma madura de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma soluble de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En otras realizaciones, ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma completa de un polipéptido IL-15Ra de mamífero de origen natural. En una realización específica, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma precursora del polipéptido IL-15 humano de origen natural. En otra realización, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma madura del polipéptido IL-15 humano de origen natural. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma soluble de un polipéptido IL-15Ra humano de origen natural. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de origen natural codifican la forma completa de un polipéptido IL-15Ra humano de origen natural.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "derivado de IL-15Ra" y "derivado del receptor alfa de interleuquina 15" en el contexto de una proteína o polipéptido se refieren a: (a) un polipéptido que es idéntico al menos en 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a un polipéptido IL-15 de mamífero nativo; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que es idéntica al menos en 40%,  
 45 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% , 98% o 99% una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo; (c) un polipéptido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 3, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de aminoácidos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo; (d) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar en condiciones de hibridación de alto, moderado o típico rigor con una secuencia de  
 50 ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo; (e) un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar en condiciones de hibridación de alto, moderado o típico rigor con secuencias de ácido nucleico que codifican un fragmento de un polipéptido IL-15 de mamífero nativo de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, al menos 40 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos; o (f) un  
 55 fragmento de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo. Los derivados de IL-15Ra también incluyen un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una forma madura de origen natural de un polipéptido IL-15Ra de mamífero y una secuencia de aminoácidos del péptido señal heterólogo. En una realización específica, el derivado de IL-15Ra es un derivado de un polipéptido IL-15Ra humano nativo. En otra realización, el derivado de IL-15Ra es un derivado de una forma inmadura polipéptido IL-15 humano de origen natural. En otra realización, el derivado de  
 60 IL-15Ra es un derivado de una forma madura de un polipéptido IL-15 humano de origen natural. En una realización, el derivado de IL-15Ra es la forma soluble de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo. En una realización específica, el derivado de IL-15Ra está purificado o aislado.

En una realización preferida, los derivados de IL-15Ra conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo para unirse a un polipéptido IL-15, como se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, Biacore, co-inmunoprecipitación. En otra realización preferida, los derivados de IL-15Ra conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo para inducir la transducción de la señal mediada por IL-15, como se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de desplazamiento por electromovilidad, ELISA y otros inmunoanálisis.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "derivado de IL-15Ra" y "derivado del receptor alfa de interleuquina 15" en el contexto de los ácidos nucleicos se refieren a: (a) una secuencia de ácido nucleico que es idéntica al menos en 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero; (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es idéntica al menos en 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo; (c) una secuencia de ácido nucleico que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más mutaciones de ácidos nucleicos (es decir, adiciones, deleciones y/o sustituciones) con respecto a la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero; (d) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación de alto, moderado o típico rigor con una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero; (e) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación de alto, moderado o típico rigor con un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero; y (f) una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero. En una realización específica, el derivado de IL-15Ra en el contexto de los ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica un polipéptido IL-15Ra humano. En otra realización, el derivado de IL-15Ra en el contexto de los ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica una forma inmadura de un polipéptido IL-15Ra humano. En otra realización, el derivado de IL-15Ra en el contexto de los ácidos nucleicos es un derivado de una secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica una forma madura de un polipéptido IL-15Ra humano. En una realización, el derivado de IL-15Ra se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-15Ra de mamífero que es soluble.

Las secuencias de ácido nucleico del derivado de IL-15Ra incluyen secuencias de ácido nucleico de codones optimizados que codifican el polipéptido IL-15Ra nativo, incluyendo las formas maduras e inmaduras de polipéptido IL-15Ra. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos del derivado de IL-15Ra incluyen ácidos nucleicos que codifican transcritos de ARN de IL-15Ra que contienen mutaciones que eliminan los sitios de empalme y elementos de inestabilidad potenciales (p. ej., elementos ricos A/T o A/U) sin afectar a la secuencia de aminoácidos para aumentar la estabilidad de los transcritos de ARN de IL-15Ra.

En una realización preferida, las secuencias de ácido nucleico del derivado de IL-15Ra codifican proteínas o polipéptidos que conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un polipéptido IL-15Ra de mamífero nativo para unirse a IL-15, como se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, Biacore, co-inmunoprecipitación. En otra realización preferida, las secuencias de ácido nucleico del derivado de IL-15Ra codifican proteínas o polipéptidos que conservan al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la función de un IL-15Ra de mamífero nativo para inducir la transducción de la señal mediada por IL-15, como se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de desplazamiento por electromovilidad, ELISA y otros inmunoanálisis.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "IL-15Ra" y "receptor alfa de interleuquina 15" se refieren a un IL-15Ra nativo, un derivado de IL-15Ra, o un IL-15Ra nativo y un derivado de IL-15Ra.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "complejo IL-15/IL-15Ra" se refiere a un complejo que comprende IL-15 e IL-15Ra unidos entre sí covalentemente o no covalentemente. En una realización preferida, el IL-15Ra tiene una afinidad relativamente alta por IL-15, p. ej.,  $K_d$  de 10 a 50 pM según se mide por un mecanismo conocido en la técnica, p. ej., análisis KinEx A, resonancia de plasmón superficial (p. ej., análisis de BIACore). En otra realización preferida, el complejo de IL-15/IL-15Ra induce la transducción de la señal mediada por IL-15, según se mide mediante análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de desplazamiento por electromovilidad, ELISA y otros inmunoanálisis. En algunas realizaciones, el complejo de IL-15/IL-15Ra conserva la capacidad de unirse específicamente a la cadena  $\beta\gamma$ .

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente y se refieren a un mamífero tal como un no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (p. ej., mono y ser humano), más preferiblemente un ser humano.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "purificado" y "aislado" en el contexto de un compuesto o agente (incluyendo, p. ej., agentes proteicos tales como anticuerpos) que se sintetizan químicamente se refieren a un compuesto o agente que está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. En una realización específica, el compuesto o agente están libres en 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% (en peso seco) de otros, compuestos o agentes diferentes.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "purificado" y "aislado" cuando se utilizan en el contexto de un compuesto o agente (incluyendo los agentes proteicos tales como anticuerpos y polipéptidos) que se pueden obtener de una fuente natural, p. ej., células, se refieren a un compuesto o agente que están sustancialmente libres de materiales contaminantes de la fuente natural, p. ej., partículas del suelo, minerales, productos químicos del entorno, y/o materiales celulares de la fuente natural, tal como, pero no limitados a, restos celulares, materiales de paredes celulares, membranas, orgánulos, la mayor parte de los ácidos nucleicos, hidratos de carbono, proteínas, y/o los lípidos presentes en las células. La frase "sustancialmente libre de materiales de origen natural" se refiere a preparaciones de un compuesto o agente que se ha separado del material (p. ej., componentes celulares de las células) a partir del cual se aísla. Por lo tanto, un compuesto o agente que está aislado incluye preparaciones de un compuesto o agente que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, o 1% (en peso seco) de materiales celulares y/o materiales contaminantes.

Una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos "aislada" es aquella que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en una fuente natural de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de nucleótidos. Por otra parte, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material o medio de cultivo celular cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos cuando se sintetiza químicamente. En ciertas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos "aislada" es una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos que se expresa de forma recombinante en una célula heteróloga.

En algunas realizaciones, los términos "ácido nucleico", "nucleótido" y "polinucleótido" se refieren a desoxirribonucleótidos, ácidos desoxirribonucleicos, ribonucleótidos y ácidos ribonucleicos, y formas poliméricas de los mismos, e incluyen formas de hebra sencilla o de doble hebra. En ciertas realizaciones, tales términos incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales, por ejemplo, ácidos peptidonucleicos ("PNA"), que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. En algunas realizaciones, tales términos se refieren a los ácidos desoxirribonucleicos (p. ej., ADNc o ADN). En otras realizaciones, tales términos se refieren a ácido ribonucleico (p. ej., ARNm o ARN).

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier protocolo, método, composición, formulación, y/o agente que se puede utilizar en la prevención, tratamiento, control, o potenciación de una enfermedad, p. ej., cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de injerto contra anfitrión, y el rechazo de trasplantes, o un síntoma asociado con las mismas. En ciertas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a la terapia biológica, terapia de apoyo, y/u otras terapias útiles en el tratamiento, control, prevención, o alivio de una enfermedad o un síntoma asociado con las mismas conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, la terapia incluye un Agente Terapéutico Agonístico. En una realización, la terapia incluye un Agente Terapéutico Antagónico. En una realización, la terapia no es un Agente Terapéutico Agonístico. En una realización, la terapia no es un Agente Terapéutico Antagónico.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "proteína o proteínas" y "polipéptido o polipéptidos" hacen referencia indistintamente a una cadena de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, los términos "proteína o proteínas" y "polipéptido o polipéptidos" se refieren a una macromolécula que comprende los aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces peptídicos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento" en el contexto de una secuencia de nucleótidos se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 5 bases contiguas de ácido nucleico, al menos 10 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 15 bases contiguas de ácido nucleico, al menos 20 bases contiguas de ácido nucleico, al menos 25 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 40 bases contiguas de ácido nucleico; al menos 50 bases contiguas de ácido nucleico, al menos 60 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 70 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 80 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 90 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 100 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 125 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 150 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 175 bases contiguas de ácidos nucleicos, al menos 200 bases de ácido nucleico contiguas, o al menos 250 bases contiguas de ácidos nucleicos de la secuencia de nucleótidos del gen de interés, p. ej., *IL-15*, *IL-15Ra*. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN, o una variante modificada químicamente de los mismos. En una realización específica, el fragmento es un fragmento de *IL-15* o *IL-15Ra*.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento" en el contexto de un fragmento de un agente proteico (p. ej., una proteína o polipéptido) se refiere a un fragmento que se compone de 8 o más aminoácidos contiguos, 10 o más aminoácidos contiguos, 15 o más aminoácidos contiguos, 20 o más aminoácidos contiguos, 25 o más aminoácidos contiguos, 50 o más aminoácidos contiguos, 75 o más aminoácidos contiguos, 100 o más aminoácidos contiguos, 150 o más aminoácidos contiguos, 200 o más aminoácidos contiguos, 10 a 150 aminoácidos contiguos, 10 a 200 aminoácidos contiguos, 10 a 250 aminoácidos contiguos, 10 a 300 aminoácidos contiguos, 50 a 100 aminoácidos contiguos, 50 a 150 aminoácidos contiguos, 50 a 200 aminoácidos contiguos, 50 a 250 aminoácidos contiguos o 50 a 300 aminoácidos contiguos de un agente proteico, p. ej., polipéptidos *IL-15* e *IL-15Ra*.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "combinado" se refiere al uso de más de una terapia (p. ej., uno

- o más agentes profilácticos y/o terapéuticos). El uso de la expresión "combinado" no restringe el orden en que las terapias se administran a un sujeto con una enfermedad o trastorno. Una primera terapia (p. ej., un agente profiláctico o terapéutico) puede administrarse antes (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), a la vez, o después de (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia (p. ej., un agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto con una enfermedad o trastorno o un síntoma de los mismos.
- 5
- 10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "bebé humano prematuro" se refiere a un bebé humano nacido antes de las 37 semanas de edad gestacional.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "bebé humano" se refiere a un ser humano entre recién nacido y de 1 año de edad.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "niño humano" se refiere a un ser humano que tiene de 1 año a 18 años de edad.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "adulto humano" se refiere a un ser humano que tiene 18 años de edad o más.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "anciano humano" se refiere a un ser humano que tiene 65 años o más.
- 20 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia, tales como, pero no limitados a, la reducción o inhibición de la progresión, diseminación y/o la duración de una enfermedad o trastorno, la reducción o alivio de la gravedad de una enfermedad o trastorno, alivio de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, y/o la reducción de la duración de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno resultantes de la administración de una o más terapias. En realizaciones específicas, tales términos en el contexto de cáncer incluyen, pero no se limitan a, uno, dos, o tres o más resultados tras la administración de una terapia a un sujeto: (1) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (2) una reducción en la formación de un tumor; (3) la erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (4) una reducción de la diseminación metastásica; (5) una reducción de la mortalidad; (6) un aumento en la tasa de supervivencia; (7) un aumento de la duración de la supervivencia; (8) un aumento en el número de pacientes en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalización; (10) una disminución en las duraciones de hospitalización; y (11) el mantenimiento en el tamaño del tumor de manera que no aumente más de 10%, o más de 8%, o más de 6%, o más de 4%; preferiblemente el tamaño del tumor no se incrementa más de 2%.
- 25
- 30 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la inhibición de la aparición o recurrencia de una enfermedad o trastorno en un sujeto.
- 35
- Según se utilizan en la presente memoria, los términos "controlar", "controlando" y "control", en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia, que no da como resultado la curación de una enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, se administran a un sujeto una o más terapias para "controlar" una enfermedad o trastorno con el fin de prevenir la progresión o empeoramiento de los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno.
- 40
4. Breve descripción de los dibujos
- FIGs. 1A-B: Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de IL-15 humana nativa. Se muestran a secuencia de ácido nucleico (FIG. 1A) (SEC ID NO: 2) y secuencia de aminoácidos (Figura 1B) (SEC ID NO: 1). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico del péptido señal largo (subrayado) y la forma madura (en cursiva).
- 45
- FIGs. 2A-B: Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de IL-15Ra humano nativo completo. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (FIG. 2A) (SEQ ID NO: 5) y secuencia de aminoácidos (FIG. 2B) (SEQ ID NO: 3). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico del péptido señal (subrayado) y la forma madura (en cursiva).
- 50
- FIGs. 3A-B: Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de IL-15 humana nativa soluble. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (FIG. 3A) (SEQ ID NO: 6) y secuencia de aminoácidos (FIG. 3B) (SEQ ID NO: 4). Se indican la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico del péptido señal (subrayado) y la forma madura (en cursiva).
- 55
- FIGs. 4A-D: Constructo de ácido nucleico AG32 que codifica IL-15 humana optimizada. Se muestran la secuencia de

ácido nucleico (FIG. 4A) (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 4B) (SEC ID NO: 10). La FIG. 4C muestra un esquema del constructo de ácido nucleico que comprende el promotor de CMV. La FIG. 4D muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del marco de lectura abierto de la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 humana optimizada (AG32 hull15opt).

5 FIGs. 5A-D: Constructo de ácido nucleico AG59 que codifica IL-15 humana optimizada con un péptido señal y un pro-péptido de tPA. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (FIG. 5A) (SEC ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 5B) (SEC ID NO: 12). La FIG. 5C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor de CMV. La FIG. 5D muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del marco de lectura abierto de la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 humano optimizada (AG59 CMV hull15tPA6).

10 FIGs. 6A-D: Constructo de ácido nucleico AG79 que codifica IL-15Ra humano optimizado. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (FIG. 6A) (SEC ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos (FIG. 6B) (SEC ID NO: 14). La FIG. 6C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor de CMV. La FIG. 6D muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del marco de lectura abierto de la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15Ra humano (AG79 hull15Ra).

15 FIGs. 7A-D: Constructo de ácido nucleico AG98 que codifica IL-15Ra humano soluble optimizado. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (FIG. 7A) (SEC ID NO: 15) y la secuencia de aminoácidos (Figura 7B) (SEC ID NO: 16). La FIG. 7C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor de CMV. La FIG. 7D muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del marco de lectura abierto de la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15Ra humano soluble (AG98 CMV Hu sIL15Ra).

20 FIGs. 8A-D: Constructo de ácido nucleico AG151 que codifica IL-15 humana optimizada con un péptido señal de GM-CSF humano. Se muestran la secuencia de ácido nucleico (Figura 8A) (SEC ID NO: 17) y la secuencia de aminoácidos (Figura 8B) (SEC ID NO: 18). La FIG. 8C muestra un esquema del constructo de expresión de ácido nucleico que comprende el promotor de CMV. La FIG. 8D muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del marco de lectura abierto de la secuencia de ácido nucleico que codifica IL-15 humana con un péptido señal de GM-CSF humano (AG151 CMVhull15huGMCSF).

## 5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende células cancerosas humanas irradiadas modificadas genéticamente para expresar simultáneamente de forma recombinante IL-15 humana y receptor alfa de IL-15 humano ("IL-15Ra") para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano. La presente invención se refiere adicionalmente a un método para la elaboración de células cancerosas humanas irradiadas que expresan recombinantemente IL-15 humana e IL-15Ra humano, en donde dicho método comprende las etapas de: (i) introducir uno o más constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 humana nativa recombinante o un derivado de la misma e IL-15Ra humana nativa o un derivado del mismo en células cancerosas humanas aisladas de un sujeto, en donde dicho derivado de IL-15 humano conserva la función de la IL-15 nativa para unirse a IL-15Ra, y en donde dicho derivado de IL-15Ra humano conserva la función de IL-15Ra nativo para unirse a IL-15; y (ii) irradiar dichas células cancerosas humanas. La presente invención también se refiere a una célula cancerosa humana irradiada que expresa recombinantemente IL-15 humana nativa o un derivado de la misma e IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo producidos mediante el método de la presente invención. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula cancerosa humana irradiada de la presente invención. En la presente memoria se describen agentes que modulan la transducción de señales o la función de IL-15 ("Agentes Terapéuticos") y el uso de esos agentes para modular la función inmunológica. Los Agentes Terapéuticos se dirigen a la interacción entre IL-15 y su receptor y modulan la transducción de señales inducida por IL-15. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos modulan la interacción entre el complejo del receptor beta y gamma de IL-15 y complejos de compuestos de IL-15 e IL-15Ra.

La presente invención proporciona Agentes Terapéuticos que inducen la transducción de la señal mediada por IL-15 y la potenciación la función inmunológica (es decir, Agentes Terapéuticos Agonísticos). Tales Agentes Terapéuticos Agonísticos incluyen (i) complejos de IL-15/IL-15Ra que se unen al complejo receptor beta/gamma e inducen transducción de señales mediada por IL-15, (ii) secuencias de ácido nucleico que codifican IL-15 e IL-15Ra para formar tales complejos, y (iii) células que expresan tales complejos en grandes cantidades. En una realización, las grandes cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresadas por las células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces mayores que las cantidades de los complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (p. ej., células que no han sido modificadas genéticamente para expresar recombinantemente IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). Los Agentes Terapéuticos Agonísticos son útiles para la prevención, tratamiento y/o control de trastornos en los que es beneficioso potenciar determinados aspectos de la función del sistema inmunológico, en particular, funciones del sistema inmunológico que están mediadas por la señalización de IL-15. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos incluyen cáncer y enfermedades infecciosas.

5 En la presente memoria se describen Agentes Terapéuticos que reducen o inhiben la transducción de la señal de IL-15 y suprimen la función del sistema inmunológico (es decir, Agentes Terapéuticos Antagónicos"). Tales Agentes Terapéuticos Antagónicos incluyen anticuerpos que se unen inmuno específicamente a un complejo de IL-15/IL-15Ra y evitan que IL-15/IL-15Ra endógeno se una al complejo receptor beta/gamma e induzca la transducción de la señal mediada por IL-15. Los Agentes Terapéuticos Antagónicos son útiles para la prevención, tratamiento y/o control de trastornos en los que resulta beneficioso suprimir ciertos aspectos de la función inmunológica, en particular, funciones del sistema inmunológico que están mediadas por la señalización de IL-15. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedad de injerto contra anfitrión, y el rechazo del trasplante.

10 En otros aspectos, se describen en la presente memoria un Agente Terapéutico Agonístico o un Agente Terapéutico Antagónico formulados con cualquier fibra polimérica natural adecuada para uso biomédico, incluyendo, pero no limitada a, quitina y quitosano, derivados de fuentes de moluscos, hongos, o microalgas. En una realización preferida, la fibra de polímero es poli-β-1→4-N-acetilglucosamina (p-GlcNAc), incluyendo formas desacetiladas de pGlcNAc. En una realización específica, el Agente Terapéutico Agonístico o el Agente Terapéutico Antagónico formulados con un polímero natural se administran a un sujeto. En una realización, el Agente Terapéutico Agonístico o Agente Terapéutico Antagónico se purifican.

15 Los Agentes Terapéuticos pueden ser utilizados ventajosamente en la terapia combinada. La terapia combinada incluye la administración concurrente y sucesiva de un agente terapéutico y otra terapia. Según se utiliza en la presente memoria, se dice que el agente terapéutico y otra terapia se administran simultáneamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo, de forma simultánea, o con un período de separación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 horas. En contraste, se dice que el agente terapéutico y la terapia se administran sucesivamente si se administran al paciente en días diferentes, por ejemplo, el agente terapéutico y la terapia se pueden administrar a intervalos de 1 día, 2 días o 3 días. En los métodos de la presente invención, la administración del agente terapéutico puede preceder o seguir a la administración de la segunda terapia.

20 Como ejemplo no limitante, el agente terapéutico y la otra terapia se pueden administrar concurrentemente durante un primer período de tiempo, seguido de un segundo período de tiempo en el que se alterna la administración del agente terapéutico y la otra terapia.

25 Cuando se administran de forma simultánea, el agente terapéutico y la otra terapia puede estar en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones farmacéuticas.

30 Las subsecciones siguientes describen con más detalle Agentes Terapéuticos, análisis de escrutinio para la identificación o validación de Agentes Terapéuticos, métodos para la caracterización de Agentes Terapéuticos, formulaciones que comprenden los Agentes Terapéuticos, y métodos de uso de los Agentes Terapéuticos para modular la función del sistema inmunitario.

### 5.1. Agentes terapéuticos

35 Se describen en la presente memoria Agentes Terapéuticos que modulan la función o señalización mediadas por IL-15. En particular, la presente invención proporciona Agentes Terapéuticos que potencian la función o señalización mediadas por IL-15 (es decir, Agentes Terapéuticos Agonísticos). La administración de un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto que lo necesita potencia la función o señalización mediadas por IL-15, lo que a su vez da como resultado la potenciación de ciertos aspectos de la función inmunológica en el sujeto. La potenciación de la función inmunológica puede estar en forma de, p. ej., una respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una respuesta inmunitaria celular, p. ej., secreción de citoquinas (p. ej., interferón-gamma), actividad coadyuvante o la citotoxicidad celular. En una realización, la potenciación de la función inmunológica incrementa la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T, y/o la proliferación de células NK.

40 En la presente memoria también se describen Agentes Terapéuticos que inhiben o reducen la función o señalización mediadas por IL-15 (es decir, Agentes Terapéuticos Antagónicos). La administración de un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto que lo necesita suprime o disminuye la función o señalización mediadas por IL-15, lo que a su vez da como resultado la supresión de ciertos aspectos de la función inmunológica en el sujeto. La supresión de la función inmunológica puede estar en forma de, p. ej., una menor respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una menor respuesta inmunitaria celular, p. ej., secreción de citoquinas (p. ej., interferón gamma), actividad coadyuvante o citotoxicidad celular. En una realización, la supresión de la función inmunológica disminuye la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T, y/o la proliferación de células NK.

#### 5.1.1. Complejos de Proteína

55 También se describen en la presente memoria Agentes Terapéuticos que son complejos que comprenden IL-15 unida covalentemente o no covalentemente a IL-15Ra ("complejos de IL-15/IL-15Ra"). El complejo de IL-15/IL-15Ra es capaz de unirse al complejo receptor βγ. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos Agonísticos son complejos de IL-15/IL-15Ra que pueden inducir la transducción de la señal mediada por IL-15, p. ej., la transducción

de señales de la ruta Jak/Stat mediada por IL-15. Tal inducción de la señalización mediada por IL-15 da como resultado la potenciación de la función inmunológica en un sujeto.

Los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden estar compuestos por IL-15 nativa o un derivado de IL-15 e IL-15Ra nativo o un derivado de IL-15Ra. En una realización específica, el complejo de IL-15/IL-15Ra se compone de un derivado de IL-15 y un derivado de IL-15Ra. En una realización, el derivado de IL-15Ra es una forma soluble de IL-15Ra. En una realización específica, la forma soluble de IL-15Ra carece del dominio transmembrana de IL-15Ra nativo, y opcionalmente, el dominio intracelular de IL-15Ra nativo. En otra realización, el derivado de IL-15Ra es el dominio extracelular de IL-15Ra nativo o un fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, el derivado de IL-15Ra es un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo. En algunas realizaciones, el derivado de IL-15Ra comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y al menos un aminoácido que está codificada por el exón 3. En ciertas realizaciones, el derivado de IL-15Ra comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y una región bisagra de IL-15Ra o un fragmento de la misma. En una realización específica, el derivado de IL-15Ra está codificado por una secuencia de ácido nucleico optimizada para aumentar la expresión de IL-15Ra, p. ej., utilizando los métodos descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/812.566, presentada el 9 de Junio de 2006; y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498.

En otra realización, el derivado de IL-15Ra comprende una mutación en el sitio de escisión del dominio extracelular que inhibe la escisión por una proteasa endógena que escinde IL-15Ra nativo. En una realización específica, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra es remplazado por un sitio de escisión que es reconocido y escindido por una proteasa heteróloga conocida. Los ejemplos no limitantes de tales sitios de escisión por proteasa heteróloga incluyen Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 7), que es reconocido y escindido por la proteasa furina; y A-B-Pro-Arg-X-Y (SEQ ID NO: 8) (A y B son aminoácidos hidrófobos y X e Y son aminoácidos no ácidos) y Gly-Arg-Gly, que son reconocidos y escindidos por la proteasa trombina.

Además de IL-15 y IL-15Ra, los complejos de IL-15/IL-15Ra pueden comprender una molécula heteróloga. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar (p. ej., un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno parasitario, o un antígeno canceroso). Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen antígenos de los flavivirus, Virus del Nilo Occidental (WNV) incluyendo proteínas estructurales, p. ej., C, M, y E, y proteínas no estructurales, p. ej., NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5; antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) gp41, gp120, gp160, Nef, Gag, y Rev, Tat, Vif, Vpr, Vpu, Vpx; hemaglutinina del virus de la influenza; glicoproteína G del virus sincitial respiratorio humano; proteína del núcleo, proteína de la matriz u otras proteínas del virus del Dengue; hemaglutinina del virus del sarampión; glicoproteína gB del virus del herpes simplex tipo 2; VP1 de poliovirus I (Emini et al., 1983, Nature 304:699); una proteína de la envoltura de VIH I; antígeno de superficie de la hepatitis B; toxina de la difteria; epítipo 24M de estreptococo; pilina gonocócica; g50 de virus de la seudorrabia (gpD); virus II de la seudorrabia (gpB); gIII del virus de la seudorrabia (gpC); glicoproteína H del virus de la seudorrabia; glicoproteína E del virus de la seudorrabia; glicoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible; proteína de la matriz de la gastroenteritis transmisible; glicoproteína 38 de rotavirus porcino; proteína de la cápsida de parvovirus porcino; antígeno protector de *Serpulina hydodysenteriae*; glicoproteína 55 de la diarrea viral bovina; hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle; hemaglutinina de la gripe porcina; neuraminidasa de la gripe porcina; antígenos del virus de la enfermedad del pie y la boca; antígenos del virus del cólera porcino; antígenos del virus de la influenza porcina; antígenos del virus de la fiebre porcina Africana; *Mycoplasma hyponeumoniae*; antígenos del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa (p. ej., glicoproteína E o glicoproteína G del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa); antígenos del virus de la laringotraqueítis infecciosa (p. ej., glicoproteína G o glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa); una glicoproteína del virus de La Crosse; antígenos del virus de la diarrea neonatal del ternero; virus de la encefalomiелitis equina de Venezuela; Punta toro virus; virus de la leucemia murina; virus de tumor mamario de ratón; proteína núcleo del virus de la hepatitis B y/o antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo (véanse, p. ej., Publicación de Patente del Reino Unido Núm. GB 2034323A publicada el 4 de Junio de 1980; Ganem and Vannus, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56:651-693; Tiollais et al., 1985, Nature 317:489-495); antígeno del virus de la influenza equina o herpesvirus equino (p. ej., neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Alaska 91, neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Miami 63; neuraminidasa del virus de la influenza equina tipo A/Kentucky 81; glicoproteína B del herpes virus equino tipo 1; glicoproteína D del herpes virus equino tipo 1); antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o virus de la parainfluenza bovina (p. ej., proteína de anclaje del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV G); proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV F); proteína de la nucleocápsida del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV N); proteína de fusión del virus de la parainfluenza bovina de tipo 3; hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza bovina de tipo 3); glicoproteína 48 o glicoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina.

Otros ejemplos no limitantes de antígenos incluyen antígeno KS 1/4 de pancarcinoma, antígeno de carcinoma ovárico (CA125), fosfato del ácido prostático, antígeno específico de próstata, antígeno p97 asociado con melanoma, antígeno gp75 de melanoma, antígeno de alto peso molecular de melanoma (HMW-MAA), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno globular de la grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72,

CO17-1A; GICA 19-9, CTA-1 y LEA, antígeno 38.13 de linfoma de Burkitt, CD19, antígeno CD20, CD33 de linfoma de células B humano, antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido GM3, antígeno de trasplante específico del tumor de tipo de superficie celular (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos viralmente incluyendo antígeno T de virus tumorales de ADN y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga, antígeno de diferenciación tal como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20, antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de leucemia de células T humana, neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), receptor EphA2, mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno APO-1 de linfocito humano maligno, antígeno de diferenciación tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, y D156-22 encontrados en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C 14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF, serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T5A7 encontrado en células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en el estadio de 4-8 células.

En otras realizaciones, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar (p. ej., un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno parasitario, o un antígeno canceroso). Los ejemplos no limitantes de tales anticuerpos incluyen anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-ckit, anticuerpo anti-flt3, anticuerpo anti-hemaglutinina, anticuerpo anti-gp41, anticuerpo anti-gp120, y anticuerpo anti-glicoproteína gB de HSV-II. En otras realizaciones, el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a uno de los antígenos enumerados anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno celular (p. ej., un receptor o antígeno de la superficie celular) expresado por una célula que se desea elegir como diana. Por ejemplo, el complejo de IL-15/IL-15Ra se puede dirigir a células progenitoras CD34+ con un anticuerpo anti-CD34 para inducir el desarrollo de tales células en células NK CD56<sup>+</sup>. El complejo de IL-15/IL-15Ra se puede dirigir a células NK CD56+ con un anticuerpo anti-CD56 para inducir la proliferación de tales células.

En algunas realizaciones, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. Los ejemplos no limitantes de tales moléculas incluyen polietilenglicol (PEG), el dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento del mismo, o albúmina que aumenta la vida media de IL-15 o IL-15Ra *in vivo*. En ciertas realizaciones, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento del mismo.

En los complejos de IL-15/L-15Ra que comprenden una molécula heteróloga, la molécula heteróloga se puede conjugar con IL-15 y/o IL-15Ra. En una realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15Ra. En otra realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15.

Los componentes de un complejo de IL-15/IL-15Ra se pueden fusionar directamente, utilizando enlaces no covalentes o enlaces covalentes (p. ej., combinando secuencias de aminoácidos a través de enlaces peptídicos), y/o se pueden combinar utilizando uno o más conectores. En una realización específica, IL-15 e IL-15Ra se fusionan directamente entre sí utilizando enlaces no covalentes o enlaces covalentes (p. ej., combinando secuencias de aminoácidos a través de enlaces peptídicos), y/o se pueden combinar utilizando uno o más conectores. En realizaciones específicas, un polipéptido que comprende IL-15 e IL-15Ra fusionados directamente entre sí utilizando enlaces no covalentes o enlaces covalentes es funcional (p. ej., capaz de unirse específicamente al complejo  $\beta\gamma$  de IL-15R e inducir la transducción de la señal mediada por IL-15 y/o la función inmunológica mediada por IL-15). Los conectores adecuados para preparar los complejos de IL-15/IL-15Ra comprenden péptidos, grupos alquilo, grupos alquilo sustituidos químicamente, polímeros, o cualquier otra sustancia química unida covalentemente o no covalentemente capaz de unir entre sí dos o más componentes. Los conectores poliméricos comprenden cualquier polímero conocido en la técnica, incluyendo polietilenglicol ("PEG"). En algunas realizaciones, el conector es un péptido que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos de longitud. En una realización específica, el conector es suficientemente largo para preservar la capacidad de IL-15 para unirse a IL-15Ra. En otras realizaciones, el conector es suficientemente largo para preservar la capacidad del complejo de IL-15/IL-15Ra para unirse al complejo receptor  $\beta\gamma$  y para actuar como agonista para mediar la transducción de la señal de IL-15.

En la presente memoria se describen Agentes Terapéuticos que comprenden complejos de IL-15/IL-15Ra para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. En realizaciones concretas, los complejos de IL-15/IL-15Ra se acoplan previamente antes de su uso en los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., antes de poner en contacto las células con los complejos de IL-15/IL-15Ra o antes de administrar los complejos de IL-15/IL-15Ra a un sujeto). En otras realizaciones, los complejos de IL-15/IL-15Ra no se acoplan previamente antes de su uso en los

métodos descritos en la presente memoria. En realizaciones específicas, el complejo de IL-15/IL-15Ra se administra combinado con una composición de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto. En una realización específica, se administra un Agente Terapéutico Agonístico que comprende IL-15 e IL-15Ra fusionados directamente entre sí combinado con una composición de vacuna para potenciar una respuesta inmunitaria provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto.

### 5.1.2. Ácidos nucleicos

En la presente memoria se describen Agentes Terapéuticos que son ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra. Los ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra que son capaces de unirse entre sí covalentemente o no covalentemente para formar los complejos de IL-15/IL-15Ra descritos en la Sección 5.1.1, de más arriba. Tales complejos de IL-15/IL-15Ra se pueden unir al complejo receptor  $\beta\gamma$ , e inducir la transducción de la señal mediada por IL-15.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican IL-15 nativa son bien conocidas en la técnica y han sido descritas, para una revisión, véase, Fehniger y Caligiuri, *Blood*, 2001, 97:14-32. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican IL-15 nativa se pueden encontrar fácilmente en publicaciones y bases de datos disponibles públicamente, p. ej., el sitio web del National Center for Biotechnology Information en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Se han descrito las secuencias de ácido nucleico que codifican IL-15Ra nativo, p. ej., véase la Publicación Internacional Núm. WO 95/30695, y también se pueden encontrar fácilmente en publicaciones y bases de datos disponibles públicamente, p. ej., el sitio web del National Center for Biotechnology Information en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Se pueden utilizar mecanismos de clonación bien conocidos en la técnica para generar los ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra. Véanse, p. ej., Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1995); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2<sup>a</sup> ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Birren et al., *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, volúmenes 1 a 4, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1997-1999).

En una realización, el agente terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican IL-15Ra nativo. En otra realización, el Agente Terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es una forma soluble de IL-15Ra nativo. En una realización específica, el Agente Terapéutico comprende ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es una forma soluble de IL-15Ra que carece del dominio transmembrana de IL-15Ra nativo, y opcionalmente el dominio intracelular de IL-15Ra nativo. En otras realizaciones, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es el dominio extracelular de IL-15Ra nativo o un fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que es un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 del IL-15Ra nativo y al menos un aminoácido que es codificado por el exón 3. En ciertas realizaciones, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende un fragmento del dominio extracelular que comprende el dominio sushi o el exón 2 de IL-15Ra nativo y una región bisagra de IL-15Ra o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que consiste esencialmente en el dominio sushi o el exón 2 del receptor. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican un polipéptido quimérico que comprende IL-15 y IL-15Ra fusionados directamente entre sí. En otra realización, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende una mutación en el sitio de escisión del dominio extracelular que inhibe la escisión por una proteasa endógena que escinde IL-15Ra. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican un derivado de IL-15Ra que comprende mutaciones (en el sitio de escisión del dominio extracelular) que inhiben la escisión por una proteasa endógena. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican un derivado de IL-15Ra, en donde un sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza por un dominio heterólogo (p. ej., dominio transmembrana heterólogo) o una secuencia de aminoácidos sintética que no permite la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En ciertas realizaciones, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra que es escindido por una enzima de procesamiento endógena es mutado para inhibir la escisión y la generación de IL-15Ra soluble. En una realización, el sitio de escisión del dominio extracelular de IL-15Ra se reemplaza por un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo (p. ej., un dominio transmembrana heterólogo que es reconocido y escindido por otra enzima no relacionada con la enzima de procesamiento endógena que escinde IL-15Ra).

En una realización específica, los Agentes Terapéuticos comprenden ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra que están optimizados, p. ej., mediante optimización de codón/ARN, sustitución con secuencias señal heterólogas, y eliminación de los elementos de inestabilidad del ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican IL-15 e IL-15Ra para su expresión mediante la introducción de cambios de codones y/o la eliminación de las regiones inhibitorias en el ARNm se pueden llevar a cabo adaptando los métodos de optimización descritos, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498, para IL-15 e IL-15Ra. Véanse también las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos Núms.

60/812.566, presentada el 9 e Junio de 2006, y 60/758.819, presentada el 13 de Enero de 2007, y la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 2007/084342. Por ejemplo, se pueden mutar los sitios de empalme potenciales y los elementos de inestabilidad (p. ej., elementos ricos en A/T o A/U) dentro del ARN de IL-15 e IL-15Ra sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico para incrementar la estabilidad del ARN para su expresión. Las alteraciones utilizan la degeneración del código genético, p. ej., utilizando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas realizaciones, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservativa, p. ej., un aminoácido similar con estructura química y propiedades y/o función similares a las del aminoácido original. Tales métodos pueden aumentar la expresión de las proteínas IL-15 y/o IL-15Ra en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces o más con respecto a la expresión de las proteínas IL-15 y/o IL-15Ra codificadas por las secuencias de ácido nucleico nativas.

Adicionalmente, la secuencia del péptido señal nativo de IL-15 y/o IL-15Ra se puede remplazar por un péptido señal heterólogo, p. ej., un péptido señal de GM-CSF humano (véanse las Figs. 8A-D), el activador de plasminógeno tisular (tPA) (véanse las FIG. 5A-D), la preprolactina, la hormona de crecimiento o una proteína inmunoglobulina (p. ej., IgE). En una realización específica, el péptido señal de IL-15 se remplaza por la secuencia señal de tPA. En otras realizaciones específicas, el péptido señal de IL-15 se remplaza por el péptido señal de GM-CSF humano. Tales alteraciones pueden aumentar la expresión de las proteínas/polipéptidos de IL-15 y/o IL-15Ra en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces o más con respecto a la expresión de las proteínas de IL-15 y/o IL-15Ra con el respectivo péptido señal nativo, según se mide/detecta por medio de un mecanismo conocido por los expertos en la técnica, p. ej., ELISA.

En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 o IL-15Ra nativos, respectivamente. En realizaciones específicas, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra hibrida en condiciones de alta rigurosidad con una secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 o IL-15Ra nativos, respectivamente, o un fragmento de la misma. En una realización específica, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica IL-15 o IL-15Ra hibrida en condiciones de hibridación de rigurosidad alta, intermedia o baja con una secuencia de nucleótidos que codifica IL-15 o IL-15Ra nativos, respectivamente, o un fragmento de la misma. Se ha descrito la información referente a las condiciones de hibridación, véase, p. ej., la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. US 2005/0048549 (p. ej., párrafos 72-73).

La presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican IL-15, IL-15Ra, y una molécula heteróloga en una forma que permite a IL-15 unirse covalentemente o no covalentemente a IL-15Ra para formar complejos de IL-15/IL-15Ra. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga es un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar. Los ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen aquellos enumerados anteriormente en la Sección 5.1.1. En otras realizaciones, la molécula heteróloga es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad que se pretende prevenir, tratar y/o controlar. Los ejemplos no limitantes de tales anticuerpos incluyen aquellos enumerados anteriormente en la Sección 5.1.1 y aquellos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno de la superficie celular (p. ej., un receptor) expresado por una célula que se desea elegir como diana. En algunas realizaciones, la molécula heteróloga aumenta la estabilidad de la proteína. Los ejemplos no limitantes de tales moléculas incluyen polietilenglicol (PEG), el dominio Fc de una inmunoglobulina IgG o un fragmento del mismo, o albúmina que aumenta la vida media de IL-15 o IL-15Ra in vivo. En ciertas realizaciones, las moléculas heterólogas no son un dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento del mismo.

En esos complejos de IL-15/IL-15Ra que comprenden una molécula heteróloga, la molécula heteróloga se puede conjugar con IL-15 y/o IL-15Ra. En una realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15Ra. En otra realización, la molécula heteróloga se conjuga con IL-15.

En realizaciones específicas, IL-15 e IL-15Ra son codificados por un constructo de ácido nucleico (p. ej., constructo bicistrónico). En algunas realizaciones, IL-15 e IL-15Ra son codificados por un constructo de ácido nucleico que comprende un único marco de lectura abierto (ORF) de IL-15 e IL-15Ra. En algunas realizaciones, los IL-15 o IL-15Ra codificados por un constructo de ácido nucleico se pueden conjugar con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés. En otras realizaciones, IL-15 e IL-15Ra están codificados por dos constructos de ácido nucleico, en donde el primera constructo de ácido nucleico codifica IL-15 y el segundo constructo de ácido nucleico codifica IL-15Ra. La IL-15 codificada por el primer constructo de ácido nucleico se puede conjugar con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés. Alternativamente, o además, el IL-15Ra codificado por el segundo constructo de ácido nucleico puede estar conjugado con un ácido nucleico que codifica una molécula heteróloga, tal como un antígeno o un anticuerpo de interés.

#### 5.1.2.1. Constructos

Los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se pueden insertar en constructos de ácido nucleico para su expresión en células de mamífero, bacterias, levaduras, y Virus. IL-15 e IL-15Ra se pueden expresar de forma

recombinante a partir del mismo constructo de ácido nucleico (p. ej., utilizando un constructo de ácido nucleico bicistrónico) o a partir de constructos de ácido nucleico diferentes (p. ej., utilizando constructos de ácido nucleico monocistrónicos). En una realización, IL-15 e IL-15Ra se pueden expresar de forma recombinante a partir de un solo constructo de ácido nucleico que comprende un único marco de lectura abierto (ORF) de IL-15 e IL-15Ra.

5 Los constructos de ácido nucleico pueden comprender uno o más elementos reguladores de la transcripción unidos operativamente a la secuencia codificante de IL-15 y/o IL-15Ra. Los elementos reguladores de la transcripción están típicamente 5' con respecto a la secuencia codificante y dirigen la transcripción de los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra. En algunas realizaciones, se utilizan para controlar la transcripción uno o más de los elementos reguladores de la transcripción que se encuentran en la naturaleza para regular la transcripción del gen de IL-15  
10 nativo y/o IL-15Ra nativo. En otras realizaciones, se utilizan para controlar la transcripción uno o más elementos reguladores de la transcripción que son heterólogos con respecto al gen de IL-15 nativo y/o IL-15Ra nativo. Se puede utilizar cualquiera de los elementos reguladores de la transcripción conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los tipos de elementos reguladores de la transcripción incluyen un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, y un promotor inducible. En una realización específica, la transcripción se controla, al menos en parte, por uno o varios elementos reguladores de la transcripción de mamífero (en algunas realizaciones, humanos). En una realización específica, la transcripción se controla, al menos en parte, por un promotor fuerte, p. ej., CMV.

Los ejemplos específicos de los promotores que se pueden utilizar para controlar la transcripción incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano de SV40 (Bernt et al., 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); promotores de adenovirus (ADV), citomegalovirus (CMV), virus del papiloma bovino (BPV), parvovirus B19p6, vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de la beta-lactamasa. (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731), o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25); véanse también "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94; vectores de expresión vegetales que comprenden la región promotora de la nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120);  
20 elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de la fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional de animales, que exhiben especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes y Devel. 1:268-276), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes y Devel. 1:161-171), la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-286), y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). En otros aspectos, se puede utilizar un promotor inducible.

50 La constructos de ácido nucleico también pueden comprender uno o más elementos reguladores post-transcripcionales unidos operablemente a la secuencia codificante de IL-15 y/o IL-15Ra. Los elementos reguladores post-transcripcionales pueden estar 5' y/o 3' con respecto a la secuencia codificante y dirigir la regulación post-transcripcional de la traducción de los transcritos de ARN que codifican IL-15 y/o IL-15Ra.

En otro aspecto, el constructo de ácido nucleico puede ser un vector dirigido a un gen que reemplaza una región reguladora existente de un gen por una secuencia reguladora aislada de un gen diferente o una secuencia reguladora nueva como se describe, p. ej., en las Publicaciones Internacionales Núms. WO 94/12650 y WO 01/68882, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

El constructo de ácido nucleico seleccionado dependerá de una variedad de factores, incluyendo, sin limitación, la fuerza de los elementos reguladores de la transcripción y la célula anfitriona que se va a utilizar para expresar IL-15 y/o IL-15Ra. Los constructos de ácido nucleico puede ser un plásmido, fagémido, cósmido, vector viral, fago, cromosoma artificial, y similares. En un aspecto, los vectores pueden ser vectores episomales o de integración no homóloga, que se pueden introducir en las células anfitrionas apropiadas mediante cualquier medio adecuado

(transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, etc.) para transformarlas.

Los constructos de ácido nucleico pueden ser un plásmido o un vector de integración estable para la expresión transitoria o estable de IL-15 y/o IL-15Ra en las células anfitrionas. Para la expresión estable, el vector puede mediar la integración cromosómica en un sitio diana o en un sitio cromosómico aleatorio. Los ejemplos no limitantes de los sistemas de célula anfitriona-vector que se pueden utilizar para expresar IL-15 y/o IL-15Ra incluyen sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, retrovirus, lentivirus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico, o ADN cosmídico; y líneas celulares estables generadas mediante transformación utilizando un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, los constructos de ácido nucleico incluyen un gen marcador seleccionable, incluyendo, pero no limitados a, neo, gpt, dhfr, ada, pac, hyg, CAD y hisD.

Los constructos de ácido nucleico pueden ser monocistrónicos o multicistrónicos. Un constructo de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o en el intervalo de 2-5, 5-10 o 10-20 genes/secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico bicistrónico puede comprender en el siguiente orden un promotor, un primer gen (p. ej., IL-15), y un segundo gen (p. ej., IL-15Ra). En tal constructo de ácido nucleico, la transcripción de ambos genes es impulsada por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen es mediante un mecanismo de exploración dependiente de cap y la traducción del ARNm del segundo gen es mediante un mecanismo independiente de cap, p. ej., mediante un IRES.

Los mecanismos para poner en práctica los aspectos de esta invención emplearán, a menos que se indique lo contrario, mecanismos convencionales de biología molecular, microbiología, y la manipulación y producción de ADN recombinante, que se ponen en práctica de forma rutinaria por un experto en la técnica. Véanse, p. ej., Sambrook, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda Edición; *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (Glover, ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, Ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames y Higgins, Eds. 1984); *Transcription and Translation* (Hames y Higgins, Eds. 1984); *Animal Cell Culture* (Freshney, Ed., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller y Calos, Eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology*. Volúmenes 154 y 155 (Wu y Grossman, y Wu, Eds., respectivamente), (Mayer y Walker, Eds, 1987); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres, Scopes 1987), *Expression of Proteins in Mammalian Cells Using Vaccinia Viral Vectors in Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2 (Ausubel et al., Eds, 1991).

El constructo de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se puede administrar *in vivo* a un mamífero o transfectar a células primarias o inmortalizadas en cultivo. En ciertos aspectos, los constructos de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se administran a un mamífero para la expresión recombinante de IL-15 e IL-15Ra *in vivo* para potenciar la transducción de la señal mediada por IL-15 y para potenciar la función inmunológica asociada con la señalización de IL-15 *in vivo*. En otros aspectos, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se administran combinados con una composición de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria provocada por la administración de la composición de vacuna a un sujeto.

Los constructos de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se pueden utilizar para generar células que expresan IL-15 e IL-15Ra para la potenciación de una función inmunológica en un sujeto. En particular, tales células pueden transpresentar el complejo de IL-15/15Ra en la superficie celular a las células adyacentes que expresan el complejo del receptor  $\beta\gamma$ , induciendo de este modo la transducción de la señal mediada por IL-15. En algunas realizaciones, las células son células primarias (p. ej., células tumorales aisladas de un paciente). En otras realizaciones, las células son líneas celulares de mamífero.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15Ra se pueden utilizar para generar células de mamífero que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra en grandes cantidades para el aislamiento y purificación de IL-15 e IL-15Ra, preferiblemente IL-15 e IL-15Ra están asociados en forma de complejos. En una realización, las grandes cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados por células, que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces mayores que las cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (p. ej., células que no han sido modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15, IL-15Ra o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). En una realización específica, el IL-15Ra es la forma soluble de IL-15Ra. En una realización específica, el IL-15Ra es la forma soluble de IL-15Ra asociado con IL-15 en un heterodímero estable, lo que aumenta los rendimientos y simplifica la producción y purificación de la citoquina IL-15/IL-15Ra soluble heterodimérica bioactiva. Se pueden purificar IL-15 e IL-15Ra recombinantes utilizando métodos de producción y purificación de proteínas recombinantes bien conocidos en la técnica, p. ej., véase la Publicación Internacional Núm. WO 07/070488, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. En resumen, el polipéptido se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente al medio. El producto lisado celular o el sobrenadante que comprenden el polipéptido se pueden purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad. También se encuentran disponibles

5 otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de Fase Inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía en heparina-Sepharose™ (sustancia de filtración en gel; Pharmacia Inc., Piscataway, Nueva Jersey), la cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico), cromatografía SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio.

10 En algunas realizaciones, IL-15 e IL-15Ra son sintetizados o expresados recombinantemente por diferentes células y con posterioridad son aislados y combinados para formar un complejo de IL-15/IL-15Ra, *in vitro*, antes de la administración a un sujeto. En otras realizaciones, IL-15 e IL-15Ra son sintetizados o expresados recombinantemente por diferentes células y con posterioridad aislados y administrados simultáneamente a un sujeto en un complejo de IL-15/IL-15Ra *in situ* o *in vivo*. En otras realizaciones más, IL-15 e IL-15Ra son sintetizados o expresados juntos por la misma célula, y el complejo de IL-15/IL-15Ra formado es aislado.

### 5.1.3. Anticuerpos

15 En la presente memoria se describen anticuerpos que se unen específicamente a complejos de IL-15/IL-15Ra, anticuerpos que se unen específicamente al complejo formado cuando IL-15 e IL-15Ra se unen entre sí o anticuerpos que se unen específicamente al complejo formado entre IL-15 e IL-15Ra y evitan o reducen la transducción de la señal mediada por IL-15. Tales anticuerpos, de acuerdo con la presente descripción, pueden bloquear (estéricamente o no estéricamente) la unión del complejo de IL-15 e IL-15Ra con el complejo receptor  $\beta\gamma$  (o CD122/CD132) del receptor de IL-15. En una realización específica, el anticuerpo reduce la unión del complejo de IL-15/IL-15Ra al complejo  $\beta\gamma$  al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 500 veces, o 1.000 veces con respecto a un control negativo (p. ej., afinidad de unión del complejo de IL-15/IL-15Ra al complejo receptor  $\beta\gamma$  en ausencia del anticuerpo) como se determina mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISA, análisis basados en células, incluyendo citometría de flujo, análisis KinEx A, y análisis de resonancia de plasmón superficial (p. ej., análisis BIAcore).

20 Los anticuerpos que se unen específicamente al complejo de IL-15/IL-15Ra pueden ser producidos mediante cualquier método bien conocido en la técnica, p. ej., como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.807.715, 6.331.415, y 6.818.216; Publicaciones de las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. US 2002/0098189, US 2004/0028685, US 2005/0019330, y US 2007/0086943; la Publicación Internacional Núm. WO 02/46237; y Harlow et al., *Antibodies. A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, Nueva York, 1981).

35 Los anticuerpos que se unen específicamente a los complejos de IL-15/IL-15Ra se pueden administrar a un sujeto para evitar que los complejos de IL-15/IL-15Ra se unan al complejo receptor  $\beta\gamma$  e induzca la transducción de la señal mediada por IL-15. De este modo, tales anticuerpos pueden suprimir una función inmunológica que está asociada con la transducción de la señal de IL-15. En algunos casos, los anticuerpos descritos en la presente memoria son útiles para detectar la presencia de complejos de IL-15/IL-15Ra.

### 5.1.4. Células

40 Las células pueden modificarse genéticamente para expresar la proteína o proteínas codificadas por los constructos de ácido nucleico descritos en la Sección 5.1.2, de más arriba, en grandes cantidades. En una realización, las grandes cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados por las células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces mayores que las cantidades de los complejos de IL-15/IL-15Ra expresados de forma endógena por las células de control (p. ej., células que no han sido modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío). Además, las células pueden modificarse mediante ingeniería genética para que expresen los anticuerpos descritos en la Sección 5.1.3, de más arriba, utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica, véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.807.715, 6.331.415, y 6.818.216; las Publicaciones de Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. US 2002/0098189, US 2004/0028685, US 2005/0019330, y US 2007/0086943; la Publicación Internacional Núm. WO 02/46237; y Harlow et al., *Antibodies. A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, Nueva York, 1981). Las células anfitrionas elegidas para la expresión de los ácidos nucleicos dependerán del uso pretendido de las células. Al seleccionar las células anfitrionas se pueden tener en cuenta factores tales como que una célula glicosile de una manera similar a las células que expresan endógenamente, p. ej., IL-15 y/o IL-15Ra.

55 En una realización, la invención también proporciona un método para aumentar el rendimiento y la bioactividad de IL-15 mediante la construcción de líneas celulares que expresan tanto IL-15 como IL-15Ra soluble, y mediante la purificación del heterodímero estable, que puede ser utilizado *in vitro* o *in vivo*, p. ej., se puede administrar a un ser humano. En una realización, se aumenta la estabilidad de IL-15 cuando se produce a partir de líneas celulares que expresan de forma recombinante tanto IL-15 como IL-15Ra.

Los ejemplos no limitantes de las células anfitrionas que se pueden utilizar para expresar la proteína o proteínas codificadas por los constructos de ácido nucleico descritos en la Sección 5.1.2, de más arriba, o los anticuerpos descritos en la Sección 5.1.3, de más arriba, incluyen células de mamífero, células bacterianas, células de levadura, células primarias, células inmortalizadas, y células de insectos. En una realización específica, las células anfitrionas son una línea celular de mamífero. Los ejemplos de líneas celulares de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células COS, CHO, HeLa, NIH3T3, HepG2, MCF7, HEK, 293T, RD, PC 12, hibridomas, células pre-B, 293, 293H, K562, SkBr3, BT474, A204, M07Sb, TFβ1, Raji, Jurkat, MOLT-4, CTLL-2, MC-IXC, SK-N-MC y SK-N-MC y SK-N-DZ, SH-SY5Y, C127, N0, y BE(2)-C. Otras líneas celulares de mamífero disponibles como anfitriones para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). En otra realización, las células anfitrionas son líneas celulares inmortalizadas derivadas de un sujeto (p. ej. un sujeto humano). En otra realización, las células anfitrionas son células primarias o secundarias de un sujeto (p. ej. un sujeto humano). En una realización concreta, las células anfitrionas son células cancerosas (p. ej., células cancerosas humanas). En otra realización, las células anfitrionas son células progenitoras de células epiteliales o células endoteliales o células fetales/embrionarias o linfocitos (p. ej., células T y células B) o células madre. En otra realización más, las células anfitrionas modificadas para expresar los constructos de ácido nucleico de la Sección 5.1.2, de más arriba, son de un adulto.

En algunas realizaciones, se utilizan en la presente memoria células aisladas. En una realización específica, las células aisladas están libres en al menos 80%, 90%, 95% o 98% de un tipo celular diferente, como se mide mediante un mecanismo conocido por un experto en la técnica, tal como la citometría de flujo. En otras palabras, al menos 80%, 90%, 95% o 98% de las células aisladas son del mismo tipo celular.

En una realización específica, los constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 o IL-15Ra se pueden co-transfectar o transfectadas en las mismas células anfitrionas o células anfitrionas diferentes. Opcionalmente, un constructo de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican un gen marcador seleccionable también puede transfectarse en las mismas células para seleccionar las células transfectadas. Si los constructos de ácido nucleico que comprenden los ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra se transfectan en células diferentes, la IL-15 y el IL-15Ra expresados por las células diferentes pueden ser aislados y puestos en contacto entre sí en condiciones adecuadas para formar los complejos de IL-15/IL-15Ra descritos en la Sección 5.1.1, de más arriba. Cualquiera de los mecanismos conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para transfectar o transducir células anfitrionas con ácidos nucleicos que incluyen, p. ej., transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, e infección con virus, incluyendo pero no limitados a adenovirus, lentivirus, y retrovirus.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de un recombinante de los polipéptidos IL-15 e IL-15RA, se pueden generar las líneas celulares estables. Por ejemplo, las líneas celulares se pueden transformar utilizando los constructos de ácidos nucleicos de la Sección 5.1.2 que pueden contener un gen marcador seleccionable en el mismo constructo de ácido nucleico o en uno separado. El gen marcador seleccionable puede ser introducido en la misma célula mediante co-transfección. Después de la introducción del vector, se deja que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo para permitir el crecimiento y la recuperación de células que expresan de manera satisfactoria los ácidos nucleicos introducidos. Los clones resistentes de las células transformadas de manera estable se pueden hacer proliferar utilizando mecanismos de cultivo de tejidos bien conocidos en la técnica que son apropiados para el tipo celular. En una realización concreta, la línea celular ha sido adaptada al crecimiento en un medio libre de suero. En una realización, la línea celular ha sido adaptada al crecimiento en medio libre de suero en matraces con movimiento oscilatorio. En una realización, la línea celular ha sido adaptada al crecimiento en matraces de agitación o giratorios. En ciertas realizaciones, la línea celular se cultiva en suspensión. En realizaciones concretas, la línea celular no es adherente o se ha adaptado para crecer como células no adherentes. En ciertas realizaciones, la línea celular ha sido adaptada al crecimiento en condiciones de baja concentración de calcio. En algunas realizaciones, la línea celular se cultiva o se adapta al crecimiento en medio con poco suero.

En una realización específica, la célula anfitriona (p. ej., célula cancerosa humana) expresa de forma recombinante IL-15 y IL-15Ra completo. En otra realización específica, la célula anfitriona (p. ej., célula cancerosa humana) expresa de forma recombinante IL-15 y la forma soluble de IL-15Ra. En otra realización específica, la célula anfitriona (p. ej., célula cancerosa humana) expresa de forma recombinante IL-15 y una forma unida a membrana de IL-15Ra que no se escinde de la superficie de la célula y permanece asociada a la célula. En algunas realizaciones, la célula anfitriona (p. ej., célula cancerosa humana) que expresa de forma recombinante IL-15 y/o IL-15Ra (forma completa o soluble) también expresa de forma recombinante otro polipéptido (p. ej., una citoquina o un fragmento de la misma).

Según se describe en la presente memoria, un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención es mediante el uso de la amplificación de la dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO carentes de DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente crecientes de metotrexato como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.889.803. El polipéptido obtenido a partir de tales células puede estar en una forma glicosilada.

En una realización específica, los constructos de ácido nucleico son adecuados para su introducción y expresión en

células primarias aisladas de un sujeto. Las células primarias están diseñadas para expresar IL-15 e IL-15Ra. En una realización específica, las células primarias expresan IL-15 y el IL-15Ra completo. En una realización concreta, el IL-15Ra contiene una mutación que elimina el sitio de escisión del dominio extracelular o que reemplaza el sitio de escisión de dominio extracelular nativo por un sitio de escisión del dominio extracelular heterólogo. Cuando se administran a un sujeto, tales células pueden transpresentar el complejo de IL-15/IL-15Ra a las células adyacentes *in vivo*, mediando de ese modo la transducción de la señal mediada por IL-15 y potenciando la función del sistema inmunitario mediada por la señalización de IL-15. En otra realización específica, las células primarias expresan IL-15 y la forma soluble de IL-15Ra.

En una realización concreta, las células primarias son células cancerosas: (i) aisladas de un sujeto, p. ej. un sujeto humano (diagnosticado de cáncer); (ii) modificadas por ingeniería genética para expresar recombinantemente cualquiera de IL-15 o IL-15Ra (forma completa o soluble) o ambos; y (iii) irradiadas antes de la administración a un paciente de cáncer para potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto a los antígenos de las células cancerosas. En una realización específica, las células primarias aisladas de un sujeto (p. ej. sujeto humano) están manipuladas genéticamente para expresar de forma recombinante otro polipéptido terapéutico, p. ej., una citoquina (p. ej., IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, TNF-alfa, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , o interferón- $\gamma$ ), un factor de crecimiento o un fragmento o derivado del mismo. En una realización específica, las células primarias aisladas de un sujeto (p. ej., sujeto humano) se manipulan genéticamente adicionalmente para expresar de forma recombinante un antígeno de un cáncer. En una realización, las células irradiadas (p. ej., cáncer humano) se pueden administrar al mismo sujeto o a un sujeto diferente del que se obtuvieron las células. En una realización concreta, las células primarias se aíslan de un tumor del sujeto (p. ej., sujeto humano). En una realización, las células de una línea celular de cáncer (p. ej., línea celular de cáncer humano) se pueden manipular genéticamente para expresar de forma recombinante cualquiera de IL-15 o IL-15Ra o ambos, en donde las células son irradiadas antes de su administración a un sujeto.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para elaborar las células descritas en la presente memoria. En una realización de la descripción se hace referencia a un método para la elaboración de células cancerosas irradiadas (p. ej., células cancerosas humanas) que expresan simultáneamente IL-15 e IL-15Ra que comprende las etapas de: (i) aislar células cancerosas de un sujeto (diagnosticado de cáncer); (ii) manipular genéticamente dichas células cancerosas (p. ej., células cancerosas humanas) para que expresen de forma recombinante cualquiera de IL-15 o IL-15Ra (forma completa o soluble), o ambos; y (iii) irradiar dichas células cancerosas (p. ej., células cancerosas humanas). En alguna realización, la presente invención se refiere a un método para la elaboración de células cancerosas irradiadas (p. ej., células cancerosas humanas) que expresan simultáneamente IL-15 e IL-15Ra que comprende las etapas de: (i) aislar células cancerosas de un sujeto (diagnosticado de cáncer); (ii) introducir uno o varios constructos de ácido nucleico que codifica IL-15 recombinante o un derivado de la misma e IL-15Ra o un derivado del mismo; y (iii) irradiar dichas células cancerosas (p. ej., células cancerosas humanas). En realizaciones concretas, las células cancerosas irradiadas (p. ej., células cancerosas humanas) se administran al sujeto del cual se aislaron (u obtuvieron) las células cancerosas.

En la presente memoria se describe un método para la elaboración de células anfitrionas capaces de crecer en medio libre de suero que comprende las etapas de: (i) manipular genéticamente células anfitrionas para que expresen de forma recombinante IL-15 y/o IL-15Ra (forma completa o soluble); (ii) cultivar las células anfitrionas en medio que comprende una razón 1:1 de medio antiguo (que comprende 10% de suero) con respecto al medio nuevo; y (iii) repetir la etapa (ii) hasta que las células anfitrionas crecen a una tasa de crecimiento deseada, en donde el medio nuevo es medio libre de suero, y en donde la tasa de crecimiento deseada es la tasa de crecimiento a la que las células anfitrionas crecen cuando se cultivan en medio que comprende 10% de suero.

En la presente memoria se describe una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero o un derivado del mismo, en donde la célula expresa al menos 0,6 pg de mamífero de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la célula expresa al menos 0,1 pg, 0,5 pg, 1 pg, o 2 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la célula expresa aproximadamente 0,1 pg a 0,6 pg, 0,5 pg a 1 pg, 0,5 pg a 2 pg, o 0,1 pg a 2 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones concretas, la célula expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma que es más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero. En realizaciones específicas, la estabilidad de la proteína de IL-15 de mamífero recombinante producida por tal célula es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero como se mide mediante un mecanismo conocido por un experto en la técnica, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC). En algunas realizaciones, la IL-15 de mamífero o un derivado de la misma son estables a 32°C o 37°C durante 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días, 14 días, 1 mes, 2 meses o más. En realizaciones concretas, la célula expresa recombinantemente una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma que se degrada a una velocidad más lenta que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero. En realizaciones específicas, la velocidad de degradación de la proteína de IL-15 de mamífero recombinante (*in vitro* o *in vivo*) producido por tal célula es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces menor que la velocidad de degradación de la proteína de IL-15 endógena producida por una célula que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero como se mide por un mecanismo

conocido por un experto en la técnica, p. ej., ELISA, transferencia Western o HPSEC .

En la presente memoria se describe una célula que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero o un derivado del mismo, en donde la célula crece en medio libre de suero. En ciertas realizaciones, la célula expresa al menos 0,6 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la célula expresa al menos 0,1 pg, 0,5 pg, 1 pg, o 2 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la célula expresa aproximadamente 0,1 pg a 0,6 pg, 0,5 pg a 1 pg, 0,5 pg a 2 pg, o 0,1 pg a 2 pg de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma.

En la presente memoria se describe es una población de células que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero o un derivado del mismo, en donde la población de células expresa al menos 600 ng/millón de células de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones específicas, la población de las células expresa al menos 150 ng/millón de células por día de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la población de células expresa al menos 50 ng/millón de células por día, 100 ng/millón de células por día, 200 ng/millón de células por día, 250 ng/millón de células por día, o 300 ng/millón de células por día de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones concretas, la población de células expresa aproximadamente de 50 ng/millón de células por día a 200 ng/millón de células por día, de 100 ng/millón de células por día a 250 ng/millón de células por día, o de 50 ng/millón de células por día a 300 ng/millón de células por día de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la población de células expresa de aproximadamente 100 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, de 500 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, de 500 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células, o de 100 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma.

En realizaciones concretas, la población de células expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma que es más estable que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero. En realizaciones específicas, la estabilidad de la proteína de IL-15 de mamífero recombinante producida por tal población de células es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces más estable que la IL-15 endógena producida por una población de células que no expresa recombinantemente ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero como se mide mediante un mecanismo conocido por un experto en la técnica, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC). En algunas realizaciones, la IL-15 de mamífero o un derivado de la misma son estables a 32°C o 37°C durante 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días, 14 días, 1 mes, 2 meses o más. En realizaciones concretas, la población de células expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma que se degrada a una velocidad más lenta que la IL-15 endógena producida por una célula que no expresa de forma recombinante ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero. En realizaciones específicas, la tasa de degradación de la proteína de IL-15 de mamífero recombinante (*in vitro* o *in vivo*) producida por semejante población de células es al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, o 100 veces menor que la tasa de degradación de la proteína de IL-15 endógena producida por una población de células que no expresa de forma recombinante ni IL-15 ni IL-15Ra de mamífero como se mide mediante un mecanismo conocido por un experto en la técnica, p. ej., ELISA, transferencia western o HPSEC.

En la presente memoria se describe una población de células que expresa de forma recombinante una IL-15 de mamífero o un derivado de la misma y un IL-15Ra de mamífero o un derivado del mismo, en donde la población de células crece en medio libre de suero. En realizaciones concretas, la población de las células expresa al menos 600 ng/millón de células de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones específicas, la población de células expresa al menos 150 ng/millón de células por día de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, la población de las células expresa al menos 50 ng/millón de células por día, 100 ng/millón de células por día, 200 ng/millón de células por día, 250 ng/millón de células por día, o 300 ng/millón de células por día de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma. En realizaciones concretas, la población de células expresa de aproximadamente 50 ng/millón de células por día a 200 ng/millón de células por día, de 100 ng/millón de células por día a 250 ng/millón de células por día, o de 50 ng/millón de células por día a 300 ng/millón de células de por día de IL-15 mamíferos o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la población de células expresa aproximadamente de 100 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, de 500 ng/millón de células a 1000 ng/millón de células, de 500 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células, o de 100 ng/millón de células a 2000 ng/millón de células de IL-15 de mamífero o un derivado de la misma.

## 5.2. Polímeros

En la presente memoria se describe cualquiera de los Agentes Terapéuticos descritos en la Sección 5.1 que se va a formular con cualquier polímero natural adecuado para uso biomédico, incluyendo poli-β-1→4-N-acetilglucosamina ("p-GlcNAc"). La p-GlcNAc se puede encontrar en la quitina y el quitosano derivados de fuentes de moluscos, hongos, o microalgas. Según se describe en la presente memoria, la p-GlcNAc se purifica como se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núms. US 2004/0220140 y US 2001/0055807 y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.622.834; 5.623.064; 5.624.679; 5.686.115; 5.858.350; 6.599.720; 6.686.342; y 7.115.588. En una realización específica, el polímero está en forma de fibras. Sin embargo, se pueden utilizar otras formas, tales como polvo.

Los ejemplos de polímero adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros con una base de celulosa, xantano, poliaramidas, poliamidas, poliimididas, poliamida/imidas, poliamidohidrazidas, polihidrazidas, poliimidazoles, polibenzoxazoles, poliéster/amida, poliéster/imida, policarbonato/amidas, policarbonato/imidas, polisulfona/amidas, imidas de polisulfona, y similares, copolímeros y mezclas de los mismos. Otras clases adecuadas de polímeros que se pueden utilizar incluyen fluoruros de polivinilideno y poliácridonitrilos. Los ejemplos de estos polímeros incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.705.540; 4.717.393; 4.717.394; 4.912.197; 4.838.900; 4.935.490; 4.851.505; 4.880.442; 4.863.496; y 4.961.539; y la Solicitud de Patente Europea Núm. 0 219 878. Los polímeros pueden incluir al menos uno de cualquiera de los polímeros con una base de celulosa, poliamidas, poliaramidas, poliamida/imidas o poliimididas. En ciertas realizaciones, los polímeros incluyen poliaramidas, poliéster, uretano y politetrafluoroetileno.

En algunas realizaciones, se utilizan N-acetilglucosamina polimerizada o derivados de la misma. En una realización preferida, el polímero es poli-N-acetilglucosamina o un derivado de la misma. En ciertas realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. En otras realizaciones, la poli-N-acetilglucosamina tiene una configuración  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4.

En realizaciones específicas, el polímero es quitina, quitosano, celulosa, nailon o PET poli(tereftalato de etileno).

En otras realizaciones específicas, el polímero es biocompatible y/o biodegradable. La biocompatibilidad se puede determinar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitadas a procedimientos tales como un ensayo de elución, implantación intramuscular, o inyección intracutánea o sistémica en sujetos animales. Tales ensayos se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.686.342, o ensayos equivalentes, como se establece en las pautas de la norma ISO-10993. Los polímeros biodegradables se degradan preferiblemente en el plazo de aproximadamente 1 día, 2 días, 5 días, 8 días, 12 días, 17 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días, 55 días, 60 días, 65 días, 70 días, 75 días, 80 días, 85 días, 90 días, 95 días, o 100 días después de la administración o implantación en un paciente.

En ciertos aspectos de la invención, el polímero es inmunoneutro.

En una realización, los Agentes Terapéuticos o composiciones de los mismos se formulan con polímeros purificados, que puede ser puros en aproximadamente 100%, 99,9%, 99,8%, 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60 %, 50%, 40%, 30%, o 20%. En una realización específica, los polímeros utilizados para formular los Agentes Terapéuticos o composiciones de los mismos son puros en 90-100%.

En ciertas realizaciones, el polímero que se utiliza para formular el agente terapéutico no es uno o más de los siguientes: un hidrogel sintético iónico tal como, pero no limitado a, poli(ácido AAn-acrílico) entrecruzado y poli(metacrilato de AAm-dimetilaminoetilo), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(N-vinilpirrolidona), poli(metacrilato de metoxi-PEG). En ciertas realizaciones, el polímero no es uno o más de un poli-L-aminoácido, tal como poli-L-lisina, poli-L-arginina, poli(ácido L-glutámico), poli-L-histidina, poli(ácido D-glutámico) o una mezcla de los mismos. En ciertas realizaciones de la descripción, el polímero es uno o más de: un polímero de alginato, tal como alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de estroncio, alginato de bario, alginato de magnesio o cualquier otro alginato o una mezcla de los mismos. En ciertas realizaciones, el polímero deriva de uno o más de: un molusco, un crustáceo, un insecto, un hongo y/o una levadura. En ciertas realizaciones, los polímeros comprenden fibras de colágeno. En ciertas realizaciones de la descripción, los polímeros comprenden fibras de elastina. En ciertas realizaciones, los polímeros comprenden polímero de bloques polaxámero 407. En ciertas realizaciones, los polímeros comprenden matrices poliméricas no degradables. En ciertas realizaciones, los polímeros comprenden matrices poliméricas degradables.

Los polímeros pueden estar en forma de fibras. Las fibras pueden ser de aproximadamente 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,54, 0,50, 0,55, 0,60, o 0,65 micras de grosor y/o diámetro como se determina mediante microscopía electrónica. En realizaciones preferidas, las fibras son de aproximadamente 0,50 micras de ancho y oscilan en longitud de aproximadamente 20 a 100 micras como se determina mediante microscopía electrónica, concretamente microscopía electrónica de barrido. En otras realizaciones preferidas, las fibras son de aproximadamente de 0,50 micras de ancho y tienen una longitud que oscila de aproximadamente 50 a 100 micras como se determina mediante microscopía electrónica, concretamente, microscopía electrónica de barrido. En otras realizaciones preferidas más las fibras son de aproximadamente 0,50 micras de ancho y tienen una longitud que oscila de aproximadamente 75 a 100 micras como se determina mediante microscopía electrónica, concretamente, microscopía electrónica de barrido.

En ciertas realizaciones, se formula al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de un agente terapéutico con uno o más de los polímeros enumerados anteriormente.

En una realización, los Agentes Terapéuticos comprenden más de un tipo de polímero (p. ej., poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina y celulosa).

#### 5.2.1. Poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-Acetilglucosamina

Un polímero preferido para su uso combinado con un Agente Terapéutico es la poli-N-acetilglucosamina o uno de

sus derivados.

Según se utiliza en la presente memoria, la poli-N-acetilglucosamina incluye cualquier polímero de N-acetilglucosamina y/o glucosamina, unido covalentemente en una conformación  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 o  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 y en cualquier grado o forma de cristalinidad. En realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina es (1) una forma semicristalina de poli-N-acetilglucosamina; (2) una poli-N-acetilglucosamina que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 30 millones de daltons; (3) una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 10 millones de daltons; (4) una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-acetilglucosamina que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 10.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 2 millones de daltons; (5) una poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 4.000 monosacáridos de N-acetilglucosamina unidos covalentemente en una conformación  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons a aproximadamente 800.000 daltons; y (6) contrapartes acetiladas de los apartados (1)-(5) anteriores en las que el grado de desacetilación oscila de 1% a 99%. En realizaciones específicas, el grado de desacetilación es de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%.

También se pueden utilizar derivados, tales como derivados químicos de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina para formular los Agentes Terapéuticos. Por ejemplo, se pueden utilizar derivados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina sulfatados, derivados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina fosforilados, o derivados de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina nitrados. Adicionalmente, una o más de las unidades monosacáridas de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden contener uno o más grupos sulfonilo o uno o más grupos O-acilo. Además, uno o más de los monosacáridos de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina desacetilada pueden contener un grupo N-acilo. Uno o más de los monosacáridos de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina o de su derivado desacetilado, pueden contener un grupo O-alquilo. Una o más de las unidades monosacáridas de la poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden ser un derivado de álcali. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden contener un grupo N-alquilo. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden contener al menos un derivado desoxihalogenado. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden formar una sal. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden formar un quelato metálico. Preferiblemente, el metal es el cinc. Una o más de las unidades monosacáridas del derivado desacetilado de poli- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina pueden contener un grupo N-alquilideno o N-arilideno. Los métodos para elaborar tales derivados se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.623.064.

En realizaciones específicas, la poli-N-acetilglucosamina se obtiene mediante un procedimiento que comprende a) tratar una microalga que comprende un cuerpo celular y una fibra de poli-N-acetilglucosamina con un agente biológico (tal como ácido fluorhídrico) capaz de separar la fibra de N-acetilglucosamina del cuerpo celular durante un tiempo suficiente de manera que la fibra de poli-N-acetilglucosamina se libere del cuerpo celular; b) segregar la fibra de poli-N-acetilglucosamina del cuerpo celular; y c) eliminar los contaminantes de la fibra de poli-N-acetilglucosamina segregada. Las descripciones detalladas para elaborar poli-N-acetilglucosamina de acuerdo con tales métodos se describen en las Publicaciones de las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. US 2004/0220140 y US 2001/055807, y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.622.834; 5.623.064; 5.624.679; 5.686.115; 5.858.350; 6.599.720; 6.686.342; y 7.115.588.

Como fuente alternativa a la p-GlcNAc de microalgas, se puede utilizar p-GlcNAc purificada a partir de quitina o quitosano de crustáceos o fúngicos para formular un Agente Terapéutico de acuerdo con la presente invención.

Opcionalmente, la p-GlcNAc se utiliza en forma de fibra, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

### 5.3. Composiciones

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos, incluyendo Agentes Terapéuticos Agonísticos y Agentes Terapéuticos Antagónicos. Las composiciones incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que se pueden utilizar en la preparación de formas de dosificación unitarias. Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un Agente Terapéutico o una combinación de Agentes Terapéuticos y un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones específicas, las composiciones comprenden una cantidad eficaz de uno o más Agentes Terapéuticos y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente un Agente Terapéutico. p. ej., agente anticanceroso, agente antiviral, agente antiinflamatorio, un coadyuvante. Los ejemplos no limitantes de tales Agentes Terapéuticos se proporcionan en la Sección 5.4.5, de más abajo.

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más concretamente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, coadyuvante (p. ej. coadyuvante de Freund (completo o incompleto) o, más preferiblemente, coadyuvante MF59C.1, asequible de Chiron, Emeryville, CA), excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos puede ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos que tienen su origen en el petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En una realización, el agua es un portador cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las disoluciones salinas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, concretamente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las composiciones, si se desea, pueden contener también cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

### 5.3.1. Formulaciones con polímeros

La presente invención proporciona composiciones (y composiciones farmacéuticas) que comprenden un Agente Terapéutico que se formulan con un polímero, tal como se describe en la Sección 5.2., de más arriba. En la presente memoria se describen diversas formulaciones que comprenden un Agente Terapéutico y un polímero.

Los polímeros se pueden formular como un gel, sólido, líquido, esponja, espuma, pulverización, emulsión, suspensión, disolución, fieltro, cuerda, gasa, sutura, cuenta, microesfera, o microfibrilla.

En realizaciones específicas, los polímeros se formulan como barreras, membranas, o películas. Alternativamente, los polímeros se añaden a las barreras, las membranas, o las películas. Se pueden suministrar una barrera, membrana, o película en una variedad de tamaños normalizados, que se pueden cortar y ajustar en tamaño adicionalmente a la zona que esté siendo tratada. Alternativamente, el polímero se puede formular como una barrera, membrana, o película fabricadas de cuerdas, microcuentas, microesferas, o microfibrillas, o la composición se puede formular como un fieltro formador de barrera. Las composiciones farmacéuticas que comprenden Agentes Terapéuticos y polímeros pueden incluir un portador, un líquido neutro, gel neutro o sólido neutro farmacéuticamente aceptables.

Además, variando la razón de los componentes en dichas matrices biodegradables, se pueden ajustar las propiedades de manejo quirúrgico de la matriz celular en un rango de una matriz dimensionalmente estable, a una consistencia similar a la masilla moldeable a un gel flexible o suspensión, a un polvo o de un fluido inyectable.

En realizaciones específicas, el polímero se formula en forma de un gel. El gel puede tener una viscosidad variable. Para diversas realizaciones, se desea un gel con una viscosidad baja. Para geles inyectables, puede ser deseable una mayor viscosidad puede si se pretende que los Agentes Terapéuticos o las composiciones de los mismos permanezcan en una localización del organismo en lugar de disiparse rápidamente. La viscosidad es la cantidad que describe la resistencia de un fluido a fluir medida en centipoise (cP). Si bien el intervalo de viscosidad es un continuo. Por ejemplo, como marco de referencia, no como limitación del significado de viscosidad, los valores de viscosidad de aproximadamente 1-4 cP generalmente caracterizan composiciones fluidas. Los valores de viscosidad de alrededor de 5-14 cP generalmente caracterizan composiciones de tipo gel, mientras que valores de viscosidad de 15-20 cP son composiciones relativamente duras, tales como plásticos. La viscosidad del citoplasma de la célula es de aproximadamente 11 cP. La viscosidad se puede medir, por ejemplo, con Saybolt International B.V. (Vlaardingen. Países Bajos). Un experto en la técnica puede también utilizar otras técnicas de medición y dispositivos comunes en la técnica.

En otras realizaciones, el polímero se formula como una esponja. Cuando el polímero es una esponja, se puede transferir una cantidad predeterminada de una suspensión celular sobre la parte superior de una matriz de esponja, y la suspensión celular se puede absorber. Los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades pueden ser formulados con polímeros que comprenden típicamente una matriz de fibra de polímero con células asociadas en toda la matriz. Esto permite que un mayor número de células interactúe con las fibras y que la matriz sea capaz de absorber un gran número de células. En una realización, altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados por las células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces mayores que las cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados endógenamente por las células de control (p. ej., células que no han sido modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 e IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío).

En ciertas realizaciones, el polímero se formula como una membrana. Las membranas pueden ser porosas o relativamente continuas. En algunas realizaciones las membranas están elaboradas de fibras de polímero tejidas que han sido combinadas con Agentes Terapéuticos que comprende células que expresan IL-15 e IL-15Ra. En

realizaciones específicas, tales membranas son particularmente útiles para la liberación sobre la superficie de la piel, la superficie de los órganos internos, o la superficie de revestimiento de las cavidades del organismo.

5 En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante IL-15, y otro agente terapéutico (p. ej., una citoquina, p. ej., IL-12 o IL-15, o un receptor soluble, por ejemplo, IL-15Ra soluble) se formulan con un polímero, p. ej., un polímero descrito en la sección 5.2, de más arriba. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante IL-15Ra, y otro agente terapéutico (p. ej., una citoquina, p. ej., IL-12 o IL-15) se formulan con un polímero, p. ej., un polímero descrito en la sección 5.2, de más arriba. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante (i) IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra, y (ii) otro polipéptido terapéutico (p. ej., una citoquina, p. ej., IL-12, IL-6, o GM-CSF), se formulan con un polímero, p. ej., un polímero descrito en la sección 5.2, de más arriba. En una realización concreta, las células son irradiadas. En una realización específica, las células son células cancerosas irradiadas modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra.

15 En ciertas realizaciones, el número de células es al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1.000, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000, 100.000 o células. En realizaciones específicas, el número de células es al menos aproximadamente 100, 200, 300, 400, o 500 células. En otras realizaciones, el número de células es al menos aproximadamente 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 o 5.000 células. En otras realizaciones específicas, el número de células es al menos aproximadamente 700, 1000, 5.000, 10.000, 15.000, o 20.000 células. En algunas realizaciones, el número de células es al menos aproximadamente 5.000, 10.000, 20.000, 50.000, 75.000 o 100.000 células. En otra realización más, el número de células es al menos aproximadamente 50.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 o 500.000 células. En otras realizaciones, el número de células es al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  o más células por mg de fibra de polímero. En otras realizaciones, el número de células es al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ , o  $1 \times 10^7$  o más células por mg de fibra de polímero. En algunas realizaciones, el número de células es al menos  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  o más células por mg de fibra de polímero. En otras realizaciones, el número de células es de al menos  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  o más células por mg de fibra de polímero. En algunas realizaciones, el número de células es menor de  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ , o  $5 \times 10^8$  células.

### 5.3.2. Formulaciones sin Polímeros

30 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de cualquier manera convencional utilizando uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 Generalmente, los componentes de las composiciones farmacéuticas que comprenden Agentes Terapéuticos se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un producto concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando el agente terapéutico se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina (p. ej., PBS). Cuando el agente terapéutico se administra mediante inyección, una ampolla de agua estéril para inyectable o la solución salina se pueden proporcionar de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

40 En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos se pueden formular para su administración mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluyendo pero no limitado a, inhalación, insuflación (a través de la boca o de la nariz), administración oral, intradérmica, transdérmica, intraparenteral, intratumoral, y a través de la mucosa (p. ej., bucal, vaginal, rectal, sublingual).

En una realización específica, los Agentes Terapéuticos se formulan para su administración parenteral local o sistémica. En una realización, los Agentes Terapéuticos se formulan en una solución farmacéuticamente compatible.

45 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas que comprenden Agentes Terapéuticos que son polipéptidos o ácidos nucleicos pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrógenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante métodos convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular

adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del agente terapéutico o composiciones del mismo. Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o grageas formuladas de manera convencional.

5 Para la administración mediante inhalación, los Agentes Terapéuticos se liberan convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para liberar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos p. ej., de gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

10 Los Agentes Terapéuticos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, p. ej., inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

15 Los Agentes Terapéuticos se pueden formular también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los Agentes Terapéuticos se pueden formular también para la implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular.

25 En una realización específica, la formulación y administración de distintos agentes quimioterapéuticos, terapéuticos biológicos/inmunoterapéuticos y hormonales para uso combinado con los Agentes Terapéuticos son conocidas en la técnica y se describen en The Physicians Desk Reference, 61<sup>a</sup> ed (2007). En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos se formulan con otras terapias, tales como las descritos en la Sección 5.4 a continuación. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden las células cancerosas irradiadas que expresan de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante (i) IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) otro polipéptido terapéutico (p. ej., una citoquina, p. ej., IL-12, IL-6, o GM-CSF), se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan de forma recombinante (i) IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) otro polipéptido terapéutico (p. ej., una citoquina, por ejemplo, IL-12, IL-6, o GM-CSF), se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, una combinación de (i) Agentes Terapéuticos que son células que expresan de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más terapias diferentes, p. ej., una citoquina (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF); se formulan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, una combinación de (i) Agentes Terapéuticos que son células cancerosas irradiadas que expresan de forma recombinante IL-15 o IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más terapias diferentes, p. ej., una citoquina (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF); se formulan como composiciones farmacéuticas.

#### 5.4. Métodos profilácticos/terapéuticos

##### 5.4.1. Potenciación de la función inmunológica

45 La invención proporciona un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico para su uso en un método para el tratamiento, la prevención y/o control del cáncer en un sujeto por medio de la potenciación de la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto, en donde el Agente Terapéutico Agonístico es una célula cancerosa humana irradiada que expresa recombinantemente IL-15 humana nativa o un derivado de la misma e IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo. En la presente memoria se describen métodos para potenciar la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto, que comprende administrar un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto que lo necesite. En una realización específica, se proporcionan en la presente memoria métodos para prevenir, tratar, y/o controlar enfermedades en las que es deseable potenciar la función inmunológica, que comprende la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto que lo necesite. En realizaciones específicas, los Agentes Terapéuticos Agonísticos están formulados con polímeros descritos en la Sección 5.2, de más arriba. En otras realizaciones específicas, el método comprende una terapia combinada, en donde el Agente Terapéutico Agonístico se administra a un sujeto combinado con otra terapia, tal como las descritas a continuación, para potenciar la función inmunológica mediada por IL-15. En una realización concreta, el Agente Terapéutico Agonístico se administra combinado con una composición de vacuna para inducir o potenciar la respuesta inmunitaria provocada por la composición de vacuna.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades que se pueden prevenir, tratar o controlar por medio de una potenciación de la función inmunológica incluyen, pero no se limitan a, cáncer y enfermedades infecciosas. A continuación se describen varios tipos de cáncer y enfermedades infecciosas. En una realización específica, se puede utilizar un Agente Terapéutico Agonístico descrito en la presente memoria en el tratamiento o control de una afección asociada con el cáncer o una afección que resulta de la administración de una terapia anti-cancerosa (tal como, p. ej., quimioterapia o radiación). En otra realización, se administra un Agente Terapéutico Agonístico a un paciente diagnosticado de cáncer para aumentar la proliferación y/o la función efectora de una o más poblaciones de células inmunitarias en el paciente.

En una realización específica, un Agente Terapéutico Agonístico potencia o induce la función inmunológica en un sujeto en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto a la función inmunológica en un sujeto que no se ha administrado el Agente Terapéutico Agonístico utilizando análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISPOT, ELISA, y análisis de proliferación celular. En una realización específica, la función inmunológica es la liberación de citoquinas (p. ej., Interferón-gamma, IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, o factor de crecimiento transformante (TGF)-beta). En una realización, la función inmunológica mediada por IL-15 es la proliferación de células NK, que puede ser analizada, p. ej., mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (p. ej., CD56). En otra realización, la función inmunológica mediada por IL-15 es la producción de anticuerpos, que puede ser analizada, p. ej., mediante ELISA. En algunas realizaciones, la función inmunológica mediada por IL-15 es la función efectora, que puede ser analizada, p. ej., mediante un análisis de citotoxicidad u otros análisis bien conocidos en la técnica.

En realizaciones específicas, los ejemplos no limitantes de la función inmunológica potenciada por el Agente Terapéutico Agonístico son la proliferación/expansión de linfocitos (p. ej., aumento del número de linfocitos), la inhibición de la apoptosis de linfocitos, la activación de células dendríticas (o células presentadoras de antígeno), y la presentación de antígenos. En realizaciones concretas, una función inmunológica potenciada por el Agente Terapéutico Agonístico es la proliferación/expansión del número de o la activación de células T CD4<sup>+</sup> (p. ej., células T coayuvantes Th1 y Th2), Células T CD8<sup>+</sup> (p. ej., linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta, y células T gamma/delta), células B (p. ej., células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), las células presentadoras de antígeno, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes en tumores, células T CD122<sup>+</sup>, o células asesinas naturales (células NK). En una realización, el Agente Terapéutico Agonístico potencia la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos. En algunas realizaciones, el Agente Terapéutico Agonístico aumenta el número de células T CD4<sup>+</sup> (p. ej., células T coayuvantes Th1 y Th2), células T CD8<sup>+</sup> (p. ej., linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta, y las células T gamma/delta), células B (p. ej., células plasmáticas), células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígeno, macrófagos, mastocitos, células T asesinas naturales (células NKT), células T residentes en tumores, Células T CD 122<sup>+</sup>, o células asesinas naturales (células NK) aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más con respecto a un control negativo (p. ej., número de las respectivas células no tratadas, cultivadas o en contacto con un Agente Terapéutico Agonístico).

#### 5.4.1.1. Cáncer

La invención proporciona un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico para su uso en un método para la prevención, tratamiento, y/o control del cáncer en un sujeto humano. En realizaciones específicas, los Agentes Terapéuticos Agonísticos se formulan con los polímeros descritos en la Sección 5.2, de más arriba. En una realización específica, el Agente Terapéutico Agonístico se define como en la sección 5.4.1, el párrafo [00170] anterior.

El efecto de un Agente Terapéutico Agonístico sobre la proliferación de las células cancerosas se puede detectar mediante análisis rutinarios, tales como mediante análisis que miden la captación de timidina radiomarcada. Alternativamente, se puede medir la viabilidad celular mediante análisis que miden la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular, o mediante la liberación de [<sup>51</sup>Cr] tras la lisis celular. En una realización, la necrosis medida por la capacidad o incapacidad de una célula para absorber un colorante tal como rojo neutro, azul tripán, o azul ALAMAR<sup>TM</sup> (Page *et al.*, 1993, Intl. J. of Oncology 3:473-476). En tal análisis, las células se incuban en medios que contienen el colorante, las células se lavan, y el colorante restante, que refleja la absorción celular del colorante, se mide espectrofotométricamente.

En otra realización, el colorante es sulforrodamina B (SRB), cuya unión a proteínas se puede utilizar como una medida de la citotoxicidad (Skehan *et al.*, 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). En otra realización más, se utiliza una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un análisis colorimétrico cuantitativo para determinar la supervivencia y la proliferación de células de mamífero mediante la detección células vivas, pero no muertas (véase, p. ej., Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

En otras realizaciones, las células apoptóticas se miden tanto en los compartimentos unidos como "flotantes" de los cultivos. Ambos compartimentos se recogen eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, y

combinando ambas preparaciones después de una etapa de lavado con centrifugación (10 minutos, 2000 rpm). El protocolo para el tratamiento de cultivos de células tumorales con sulindac y compuestos relacionados para obtener una cantidad significativa de apoptosis se ha descrito en la literatura (véase, p. ej., Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16). Las características de este método incluyen la recolección de células tanto flotantes como unidas, la identificación de los tiempos de tratamiento y el intervalo de dosificación óptimos para observar la apoptosis, y la identificación de las condiciones óptimas de cultivo celular.

En otra realización, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación de ADN. Están disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa in vitro de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales análisis que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados a ADN fragmentado) y análisis basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, Núm. 2, págs. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

En otra realización más, la apoptosis se puede observar morfológicamente.

Las líneas de células cancerosas sobre las cuales se pueden realizar tales análisis son bien conocidas por los expertos en la técnica. También se pueden realizar análisis de apoptosis, necrosis y proliferación sobre células primarias, p. ej., un explante de tejido.

En una realización específica, la proliferación o viabilidad de las células cancerosas puestas en contacto con un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico son inhibidas o reducidas al menos 2 veces, preferiblemente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces con respecto a la proliferación de las células cancerosas cuando se ponen en contacto con un control negativo medido utilizando análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de proliferación celular utilizando CSFE, BrdU, e incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. En otra realización, la proliferación de células cancerosas puestas en contacto con un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico es inhibida o reducida al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% con respecto a las células cancerosas puestas en contacto con un control negativo según se mide utilizando análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de proliferación celular utilizando CSFE, BrdU, e incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, o los análisis descritos anteriormente. En un aspecto, la composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico comprende adicionalmente células (p. ej., células NK o células T citotóxicas) que son sensibles a la señalización de IL-15 y que pueden elegir como diana las células cancerosas y ejercer efectos citotóxicos sobre las mismas.

En una realización específica, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, un modelo animal para el cáncer) inhibe o reduce el crecimiento de un tumor al menos 2 veces, preferiblemente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces con respecto al crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, en el mismo modelo animal para el cáncer) al que se ha administrado un control negativo según se mide utilizando análisis bien conocidos en la técnica. En otra realización, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, un modelo animal para el cáncer) inhibe o reduce el crecimiento de un tumor al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% con respecto al crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, en el mismo modelo animal para el cáncer) al que se ha administrado un control negativo según se mide utilizando análisis bien conocidos en la técnica.

En una realización específica, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, un modelo animal para el cáncer) reduce el tamaño del tumor al menos 2 veces, preferiblemente al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 7 veces, o al menos 10 veces con respecto al crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, el mismo modelo animal para el cáncer) al que se ha administrado un control negativo según se mide utilizando análisis bien conocidos en la técnica. En otra realización, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, un modelo animal para el cáncer) reduce el tamaño de un tumor al menos 25%, al menos 30% , al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80% , al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% con respecto al crecimiento de un tumor en un sujeto con cáncer (en algunas realizaciones, el mismo modelo animal para el cáncer) al que ha administrado un control negativo según se mide utilizando análisis bien conocidos en la técnica. En una realización específica, el cáncer es melanoma, cáncer renal, cáncer de colon, o cáncer de próstata.

Además, un Agente Terapéutico Agonístico que es útil en el tratamiento o control del cáncer es una célula tumoral (o cancerosa) irradiada o una célula tumoral (o cancerosa) irradiada que expresa de forma recombinante complejos de IL-15/IL-15Ra. Tales Agentes Terapéuticos Agonísticos se pueden preparar mediante un método que comprende la

transducción o transfección de células tumorales primarias o líneas de celulares tumorales con constructos de expresión para IL-15 e IL-15Ra, y después de la expresión de las proteínas IL-15 e IL-15Ra, la irradiación de las células tumorales. En una realización, la forma de la irradiación es radiación  $\gamma$ . La IL-15 y el IL-15Ra se pueden expresar a partir del mismo constructo o constructos diferentes, y bajo el control del mismo promotor o promotores diferentes. El constructo o los constructos de expresión de IL-15 e IL-15Ra se pueden introducir en células tumorales (o cancerosas) mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando un vector viral o un vector de expresión de mamífero. Alternativamente, la IL-15 nativa y el IL-15Ra nativo de las células tumorales (o cancerosas) pueden ser activados utilizando métodos de activación génica. Posteriormente, las células tumorales (o cancerosas) irradiadas que expresan de forma recombinante los complejos de IL-15/IL-15Ra se administran en un paciente de cáncer para inducir y/o potenciar una respuesta inmunológica a las células cancerosas o a los antígenos cancerosos de las células cancerosas. En una realización específica, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un incremento de la producción de anticuerpos frente a las células cancerosas o a los antígenos cancerosos de las células cancerosas en el paciente de cáncer. En otra realización, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un incremento en la función de las células efectoras, p. ej., citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células cancerosas en el paciente. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un incremento en el número de linfocitos, la proliferación de linfocitos, y/o la actividad de los linfocitos.

Un Agente Terapéutico Agonístico se puede administrar combinado con una o más terapias diferentes, p. ej., agentes anticancerígenos, citoquinas o agentes anti-hormonales, para tratar y/o controlar el cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-cancerosos se describen en la Sección 5.4.5.1 de más abajo. En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes proporciona un efecto terapéutico aditivo con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas. En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes proporciona más de un efecto terapéutico aditivo con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas. En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes proporciona un efecto terapéutico sinérgico con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas.

En una realización, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a citoquinas/factores de crecimiento, p. ej., interleuquina (IL) 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, e interferón- $\gamma$ . En una realización, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a receptores, anticuerpos, u otros agentes de unión que se unen a citoquinas/factores de crecimiento, p. ej., Interleuquina (IL) 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, TNF-  $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, interferón- $\alpha$ , el interferón- $\beta$ , e interferón- $\gamma$ . En algunas realizaciones, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a, células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (o polipéptidos), p. ej., una citoquina, un factor de crecimiento, una quimioquina, o un fragmento o derivado de los mismos. En una realización concreta, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a, células que expresan de forma recombinante IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ . En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante IL-12. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante IL-6. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante GM-CSF. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante TNF- $\alpha$ . En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas. En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas irradiadas. En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células cancerosas irradiadas obtenidas de un paciente. En una realización, las células expresan de forma recombinante una o más proteínas terapéuticas (polipéptidos). En una realización, la presente invención proporciona una combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes, en donde el Agente Terapéutico Agonístico comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en donde las una o más terapias diferentes comprenden una o más citoquinas exógenas (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ ). En una realización, la presente invención proporciona una combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes, en donde el Agente Terapéutico Agonístico comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en donde las una o más terapias diferentes comprenden (i) polipéptido IL-15 exógeno o polipéptido IL-15Ra exógeno, y (ii) una o más citoquinas exógenas diferentes (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ ). En una realización, un Agente Terapéutico Agonístico comprende células modificadas genéticamente para expresar de forma recombinante (i) IL-15, IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más citoquinas/ factores de crecimiento.

Un Agente Terapéutico Agonístico también se puede administrar combinado con una terapia de radiación que comprende, p. ej., el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En realizaciones específicas, el tratamiento de radiación se administra en forma de radiación de haz externo o teleterapia en donde la radiación es dirigida desde una fuente remota. En otras realizaciones, el tratamiento de radiación se administra como una terapia interna o braquiterapia en donde una fuente radiactiva se coloca dentro del organismo cerca de las células cancerosas o de una masa tumoral. En un aspecto, el Agente Terapéutico Agonístico puede potenciar la función inmunológica del paciente de cáncer con un sistema inmunológico comprometido debido

a la terapia anti-cancerosa. Un Agente Terapéutico Agonístico también se puede administrar combinado con quimioterapia. En una realización, el Agente Terapéutico Agonístico se puede utilizar antes, durante o después de la terapia de radiación o la quimioterapia. En una realización, un Agente Terapéutico Agonístico se puede utilizar antes, durante o después de la cirugía. En una realización, la presente invención proporciona una combinación de trasplante y Agente Terapéutico Agonístico.

Los ejemplos no limitantes de los agentes anti-hormonales son agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX<sup>®</sup>), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE<sup>®</sup>, exemestano V AROMASIN<sup>®</sup>, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR<sup>®</sup>, letrozol FEMARA<sup>®</sup>, y anastrozol D ARIMIDEX<sup>®</sup>; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, concretamente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej., ribozima ANGIOZYME<sup>®</sup>) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN<sup>®</sup>, vacuna LEUVECTIN<sup>®</sup>, y vacuna VAXID<sup>®</sup>; rIL-2 PROLEUKIN<sup>®</sup>; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN<sup>®</sup>; rmRH ABARELX<sup>®</sup>; vinorelbina y esperamicinas (Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.675.187, y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores).

Los cánceres y trastornos relacionados que se pueden prevenir, tratar o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Leucemias incluyendo, pero no limitadas a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, leucemias eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero no limitadas a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero no limitados a la enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no limitados a mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; Macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado incierto; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas óseos y del tejido conjuntivo tales como pero no limitados a sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de partes blandas, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rhabdomyosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales, incluyendo pero no limitados a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget, y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo pero no limitado a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cánceres de tiroides, tales como, pero no limitados a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, incluyendo pero no limitado a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y carcinoide o tumor de células de los islotes; cánceres de la pituitaria, incluyendo pero no limitados a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insipidus; cánceres oculares incluyendo pero no limitados a, melanoma ocular, tal como melanoma de iris, melanoma corioideo, y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y melanoma; cáncer de la vulva, incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de endometrio y sarcoma uterino; cánceres de ovario, incluyendo pero no limitados a, carcinoma epitelial de ovario, tumor de bajo potencial de malignidad, tumor de células germinales, y tumor estromal; cánceres de esófago, incluyendo pero no limitados a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago incluyendo pero no limitados a, adenocarcinoma, fungante (polipoide), ulcerante, de extensión superficial, de extensión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectal; cánceres de hígado incluyendo, pero no limitados a carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar, incluyendo pero no limitados a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo pero no limitados a, papilar, nodular, y difuso; cánceres de pulmón incluyendo pero no limitados a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares, incluyendo pero no limitados a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino); cánceres de próstata, incluyendo pero no limitados a, adenocarcinoma, leiomiomas, y

rabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivares, incluyendo pero no limitados a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, y carcinoma adenoquístico; cánceres de faringe, incluyendo pero no limitados a, cáncer de células escamosas, y verrugoso; cánceres de piel, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, y melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma léntigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón, incluyendo pero no limitados a, cáncer de células renales, cáncer renal, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, y cáncer de células de transición (pelvis y/o uréteres renales); tumor de Wilms; cánceres de la vejiga, incluyendo pero no limitados a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, y el carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de este tipo de trastornos, véanse Fishman et al., 1985, Medicina, Ed. 2d., J.B. Lippincott Co., Philadelphia y Murphy et al, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books USA, Inc., Estados Unidos de América).

En una realización, el cáncer es benigno, p. ej., pólipos y lesiones benignas. En otras realizaciones, el cáncer es metastásico. Los Agentes Terapéuticos Agonísticos se pueden utilizar en el tratamiento de afecciones premalignas, así como malignas. Las afecciones premalignas incluyen hiperplasia, metaplasia y displasia. El tratamiento de las afecciones malignas incluye el tratamiento de tumores primarios, así como metastásicos. En una realización específica el cáncer es melanoma, cáncer de colon, y cáncer de pulmón.

En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto que padece o está diagnosticado de cáncer. En otras realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto predispuesto a o susceptible de desarrollar cáncer. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto que vive en una región donde existe una alta tasa de incidencia de cáncer. En una realización específica, el cáncer se caracteriza por un tumor premaligno o un tumor maligno.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un mamífero, que tiene de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un ser humano en riesgo de desarrollar cáncer. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un ser humano con cáncer. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años, de 5 a 10 años de edad, de 5 a 12 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 13 a 19 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 20 a 65 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un bebé humano o un bebé humano prematuro. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un niño humano. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un adulto humano. En otras realizaciones más, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un anciano humano.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un animal doméstico, p. ej., un perro o un gato. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un animal de granja o ganado, p. ej., cerdos, vacas, caballos, pollos, etc.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un primate, preferiblemente un ser humano, u otro mamífero, tal como un cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunocomprometido o un estado inmunodeprimido o en riesgo de convertirse en inmunocomprometido o inmunodeprimido. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una

5 terapia combinada se administran a un sujeto que está recibiendo o se está recuperando de la terapia inmunosupresora. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer el SIDA, una infección viral, o una infección bacteriana. En ciertas realizaciones, un sujeto que está, estará o ha sido sometido a cirugía, quimioterapia y/o terapia de radiación. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico o una terapia combinada se administran a un sujeto que vive en una residencia de ancianos, un albergue (es decir, un hogar para 10 o más sujetos), o una prisión.

10 En algunas realizaciones, se administra a un paciente un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada antes de que se desarrolle cualquier efecto adverso o intolerancia a terapias distintas de Agentes Terapéuticos Agonísticos. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a pacientes refractarios. En una cierta realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia anti-cancerosa convencional. En ciertas realizaciones, un paciente con cáncer, es refractario a una terapia cuando el cáncer no se ha erradicado de manera significativa y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para analizar la eficacia de un tratamiento, utilizando los significados de "refractario" aceptados en la técnica en tal contexto. En diversas realizaciones, un paciente de cáncer es refractario cuando un tumor canceroso no ha disminuido o ha aumentado.

20 En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un paciente para prevenir la aparición o reaparición del cáncer en un paciente en riesgo de desarrollar tal cáncer. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un paciente que es susceptible de reacciones adversas a las terapias convencionales.

25 En algunas realizaciones, se administran uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas a un paciente que ha demostrado ser refractario a terapias distintas de Agentes Terapéuticos Agonísticos, pero ya no están con estas terapias. En ciertas realizaciones, los pacientes que están siendo controlados o tratados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria son pacientes que ya están siendo tratados con antibióticos, agentes anti-cancerosos, u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes son pacientes refractarios los pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales, y los pacientes con infecciones virales recurrentes a pesar del control o el tratamiento con las terapias existentes.

35 En algunas realizaciones, el sujeto al que se están administrando una o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas no ha recibido una terapia previa a la administración de los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas. En otras realizaciones, uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas se administran a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas. En algunas realizaciones, el sujeto al que se administra un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico fue refractario a una terapia previa o experimentó efectos secundarios adversos a la terapia previa o la terapia previa se suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad en el sujeto.

#### 5.4.1.2. Enfermedades Infecciosas

45 En la presente memoria se describe un método para tratar, prevenir y/o la controlar una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto que lo necesite.

50 En una realización concreta, los Agentes Terapéuticos Agonísticos son células infectadas con un patógeno, en donde las células se modifican genéticamente para que expresen IL-15 e IL-15Ra como se describe en la Sección 5.1.1, se irradian, y se administran a un paciente para inducir y/o potenciar una respuesta inmunológica a las células infectadas o a los antígenos del patógeno. En una realización, el patógeno es un patógeno intracelular, p. ej., una bacteria o virus intracelulares. En una realización específica, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en el incremento en la producción en el paciente de anticuerpos contra las células infectadas o contra los antígenos del patógeno. En una realización, la forma de la irradiación es radiación  $\gamma$ . La IL-15 o el IL-15Ra se pueden expresar a partir del mismo constructo o de constructos diferentes, y bajo el control del mismo promotor o promotores diferentes. El constructo o los constructos de expresión de IL-15 e IL-15Ra se pueden introducir en las células infectadas con un patógeno mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando un vector viral o un vector de expresión de mamífero. Alternativamente, la IL-15 nativa y el IL-15Ra nativo de las células infectadas con un patógeno pueden ser activados utilizando métodos de activación génica. Posteriormente, las células irradiadas infectadas con un patógeno que expresa de forma recombinante complejos de

- IL-15/IL-1 5RA se administran a un sujeto para inducir y/o potenciar una respuesta inmunológica contra el patógeno o a los antígenos del patógeno. En una realización específica, la respuesta inmunológica inducida o potenciada incrementa la producción de anticuerpos contra el patógeno. En otra realización, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un aumento en la función de las células efectoras, p. ej., citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra el patógeno y/o las células infectadas con un patógeno en el paciente. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un aumento en el número de linfocitos, la proliferación de linfocitos, y/o la actividad de los linfocitos. En otra realización, la respuesta inmunológica inducida o potenciada consiste en un aumento en la función de células efectoras, p. ej., células citotóxicas o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células infectadas en el paciente.
- En otras realizaciones, se puede administrar un Agente Terapéutico Agonístico combinado con una o más terapias diferentes. Los ejemplos no limitantes de las terapias diferentes que se pueden utilizar combinadas con los Agentes Terapéuticos Agonísticos se describen en las Secciones 5.4.5.2 y 5.4.5.3. En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes proporciona un efecto terapéutico aditivo con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas.
- En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y las una o más terapias diferentes proporciona un efecto terapéutico aditivo con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas. En una realización, la combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes proporciona un efecto terapéutico sinérgico con respecto a los efectos terapéuticos del Agente Terapéutico Agonístico solo o las una o más terapias diferentes solas.
- En una realización, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a citoquinas/factores de crecimiento, p. ej., interleuquina (IL) 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, e interferón- $\gamma$ . En una realización, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a receptores, anticuerpos, u otros agentes de unión que se unen a citoquinas/factores de crecimiento, p. ej., interleuquina (IL) 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , e interferón- $\gamma$ .
- En algunas realizaciones, las una o más terapias incluyen, pero no se limitan a, células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (o polipéptidos), p. ej., una citoquina, un factor de crecimiento, una quimioquina, o un fragmento o derivado de los mismos. En una realización concreta, las uno o más terapias incluyen, pero no se limitan a, células que expresan de forma recombinante IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ . En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante IL-12. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante IL-6. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante GM-CSF. En una realización, las una o más terapias no son células que expresan de forma recombinante de TNF- $\alpha$ . En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células infectadas con un patógeno o agente infeccioso. En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células irradiadas infectadas con un patógeno o agente infeccioso. En una realización específica, las células que expresan de forma recombinante una proteína terapéutica (polipéptido) son células irradiadas infectadas con un patógeno o agente infeccioso obtenido de un paciente. En una realización, las células expresan de forma recombinante una o más proteínas terapéuticas (polipéptidos). En una realización, es posible una combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más de otras terapias, en donde el Agente Terapéutico Agonístico comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en donde las uno o más terapias diferentes comprenden una o más citoquinas exógenas (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ ). En una realización, es posible una combinación de un Agente Terapéutico Agonístico y una o más terapias diferentes, en donde el Agente Terapéutico Agonístico comprende células que expresan de forma recombinante IL-15 e IL-15Ra, y en donde las una o más terapias diferentes comprenden (i) polipéptido IL-15 exógeno o polipéptido IL-15Ra exógeno, y (ii) una o más citoquinas exógenas diferentes (p. ej., IL-12, IL-6, GM-CSF, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ ). En una realización, un Agente Terapéutico Agonístico comprende células manipuladas genéticamente para expresar de forma recombinante (i) IL-15, IL-15Ra, o IL-15 e IL-15Ra; y (ii) una o más citoquinas/ factores de crecimiento.
- Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar, prevenir y/o controlar por medio de los Agentes Terapéuticos Agonísticos están causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a bacterias, hongos, protozoos, y virus.
- Las enfermedades víricas que pueden se prevenir, tratar y/o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simplex tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), virus de la peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus de Cocksackie, virus de papeas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II), y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.
- Las enfermedades bacterianas causadas por bacterias (p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, y *Pseudomonas aeruginosa*) que se puede prevenir, tratar y/o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la

presente memoria incluyen, pero no se limitan a, *micobacterias rickettsia*, *micoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (antrax), *tétanos*, *estreptococos*, *estafilococos*, *micobacteria*, *pertussis*, *cólera*, *peste*, *difteria*, *clamidia*, *S. aureus* y *legionella*.

5 Las enfermedades de protozoos causadas por protozoos que se pueden prevenir, tratar y/o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, leishmania, coccidia, tripanosoma o malaria.

Las enfermedades parasitarias causadas por parásitos que se pueden prevenir, tratar y/o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, clamidia y rickettsia.

10 En ciertas realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En otras realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso inhibe o reduce la replicación del agente infeccioso en 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

25 En ciertas realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso en el menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, en 30 menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En otras realizaciones, la administración de un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) infectado con un agente infeccioso reduce el título del agente infeccioso en un 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

35 En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto que padece una enfermedad infecciosa causada por agentes infecciosos incluyendo, pero no limitados a bacterias, hongos, protozoos, y virus. En otras realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto predispuesto o susceptible a una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un sujeto que vive en 50 una región en la que se ha producido o podría producirse un brote de infecciones por agentes infecciosos. En algunas realizaciones, la infección es una infección latente. En otras realizaciones, la infección por el agente infeccioso es una infección activa. En otras realizaciones, la infección por el agente infeccioso es una infección viral crónica. En una realización específica, la infección es una infección viral. En una realización específica, el virus infecta a los seres humanos.

55 En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un mamífero, que tiene de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, 10 a 15 años de edad, 15 a 20 años de edad, 20 a 25 años de edad, 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, 60 a 65 años de edad, 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, 75 a 80 años de edad, 80 a 85 años de edad, 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una

composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un ser humano en riesgo de una infección por virus. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un ser humano con una infección por virus. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, 5 a 10 años de edad, de 5 a 12 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 13 a 19 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 20 a 65 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un bebé humano o un bebé humano prematuro. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un niño humano. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un adulto humano. En otras realizaciones más, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un anciano humano.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un animal doméstico, p. ej., un perro o un gato. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un animal de granja o ganado, p. ej., cerdos, vacas, caballos, pollos, etc. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un ave, p. ej., patos o pollos.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un primate, preferiblemente un ser humano, u otro mamífero, tal como cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunocomprometido o estado inmunodeprimido o en riesgo de convertirse en inmunocomprometido o inmunodeprimidos. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que está recibiendo o se está recuperando de la terapia inmunosupresora. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico o una terapia combinada se administran a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer cáncer, SIDA, otra infección, o una infección bacteriana. En ciertas realizaciones, el sujeto está, estará o ha estado sometido a cirugía, quimioterapia y/o terapia de radiación. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que tiene fibrosis quística, fibrosis pulmonar, u otra enfermedad que hace que el sujeto sea susceptible a una infección. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que tiene, tendrá o ha tenido un trasplante de tejido. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico o una terapia combinada se administra a un sujeto que vive en una residencia de ancianos, un albergue (p. ej., Un hogar para 10 o más sujetos), o una prisión. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que asiste a la escuela (p. ej., escuela primaria, escuela media, secundaria, bachillerato o universidad) o en la guardería. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que trabaja en el área de la salud, tal como un médico o una enfermera, o en un hospital. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que está embarazado o quedará embarazado.

En algunas realizaciones, se administra a un paciente un Agente Terapéutico Agonístico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico, o una terapia combinada antes de que éste desarrolle cualquier efecto adverso o intolerancia a las terapias distintas de los Agentes Terapéuticos Agonísticos. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a pacientes refractarios. En una cierta realización, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia convencional. En ciertas realizaciones, un paciente con una infección, es refractario a una terapia cuando la infección no se ha erradicado significativamente y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para analizar la eficacia de un tratamiento de infecciones, utilizando los significados "refractario" aceptados en la técnica en semejante contexto. En diversas realizaciones, un paciente con una infección es refractario cuando la replicación del agente infeccioso no ha disminuido o ha aumentado.

En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un paciente para prevenir la aparición o reaparición de infecciones (p. ej., infecciones virales) en un paciente con riesgo de desarrollar tales infecciones. En

algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas se administran a un paciente que es susceptible de las reacciones adversas a las terapias convencionales.

5 En algunas realizaciones, se administran uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas a un paciente que ha demostrado ser refractario a terapias distintas de los Agentes Terapéuticos Agonísticos, pero ya no está con estas terapias. En ciertas realizaciones, los pacientes que están siendo controlados o tratados de acuerdo con esta invención son paciente que ya están siendo tratados con antibióticos, antivirales, antifúngicos, u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes son pacientes refractarios los pacientes que son demasiado jóvenes  
10 para las terapias convencionales, y los pacientes con infecciones virales recurrentes a pesar del control o el tratamiento con las terapias existentes.

15 En algunas realizaciones, el sujeto al que se están administrando uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas no ha recibido un tratamiento previo a la administración de los Agentes Terapéuticos Agonísticos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o las terapias combinadas. En otras realizaciones, uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Agonísticos o terapias combinadas se administran a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos o composiciones que comprende uno o más Agentes Terapéuticos Agonísticos, o tratamientos combinados. En algunas realizaciones, el sujeto al que se ha administrado un Agente Terapéutico  
20 Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico fue refractario a una terapia previa o experimentó efectos secundarios adversos a la terapia previa o la terapia previa se suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad en el sujeto.

#### 5.4.2. Supresión de la función inmunológica

25 Se describen en la presente memoria métodos para suprimir la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto, que comprenden administrar un Agente Terapéutico Antagónico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto que lo necesite. En una realización específica, se describen en la presente memoria métodos para prevenir, tratar, y/o controlar enfermedades en las que es deseable suprimir la función inmunológica, que comprenden administrar un Agente Terapéutico Antagónico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto que lo necesite. En realizaciones específicas, los Agentes Terapéuticos Antagónicos se formulan con polímeros descritos en la Sección 5.2, de más arriba. En otras  
30 realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico se puede administrar combinado con una o más terapias diferentes para suprimir una función inmunológica mediada por IL-15. Los ejemplos no limitantes de las enfermedades que se pueden prevenir, tratar o controlar mediante la supresión de la función inmunológica incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitaria, trastornos inflamatorios, enfermedad de injerto contra anfitrión, y rechazo de trasplantes.  
35

En una realización específica, un Agente Terapéutico Antagónico suprime o reduce la función inmunológica mediada por IL-15, p. ej., la proliferación de las células NK y la producción de citoquinas.

40 En una realización específica, un Agente Terapéutico Antagónico suprime la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, en menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto a la función inmunológica en un sujeto al que no se ha administrado el agente terapéutico utilizando análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., ELISPOT, ELISA y análisis de proliferación celular. En una realización específica, la función inmunológica consiste en la liberación o producción de citoquinas (p. ej., Interferón-gamma). En una  
45 realización, la función inmunológica mediada por IL-15 consiste en la proliferación de células NK, que se puede analizar, p. ej., mediante citometría de flujo para detectar el número de células que expresan marcadores de células NK (p. ej., CD56). En una realización, la función inmunológica mediada por IL-15 consiste en la proliferación y/o activación de células T (células CD4<sup>+</sup> y/o células CD8<sup>+</sup>).

50 En realizaciones específicas, un Agente Terapéutico Antagónico puede inhibir o reducir la proliferación/expansión de los linfocitos (p. ej., el número de linfocitos), inducir o aumentar de la apoptosis de los linfocitos, inhibir la activación de las células dendríticas (o células presentadoras de antígeno), y la presentación de antígenos. En realizaciones concretas, una función inmunológica suprimida por un Agente Terapéutico Antagónico consiste en la proliferación/expansión/activación de las células T CD4<sup>+</sup> (p. ej., células T ayudantes Th1 y Th2), Células T CD8<sup>+</sup> (p. ej., linfocitos T citotóxicos, células T alfa/beta, y células T gamma/delta), células B (p. ej., células plasmáticas),  
55 células T de memoria, células B de memoria, células dendríticas (inmaduras o maduras), células presentadoras de antígenos, macrófagos, mastocitos, o células asesinas naturales. En una realización, el Agente Terapéutico Antagónico disminuye/reduce la proliferación/expansión o el número de progenitores de linfocitos.

En una realización específica, un Agente Terapéutico Antagónico suprime la función inmunológica mediada por IL-15 en un análisis basado en células (p. ej., analizando la proliferación de una línea celular sensible a IL-15 tal como

CTLL-2 o TFβ1) en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto a un control negativo según se determina utilizando análisis bien conocidos en la técnica, p. ej., análisis de proliferación celular con CSFE, BrdU, e incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. En una realización específica, la función inmunológica consiste en la liberación de citoquinas (p. ej., interferón-gamma). En realizaciones concretas, la actividad de un Agente Terapéutico Antagónico en análisis basados en células y en experimentos con modelos animales se correlaciona con la función *in vivo* del Agente Terapéutico Antagónico para suprimir la función inmunológica mediada por IL-15.

Las diferentes enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias que se pueden prevenir, tratar y/o controlar se enumeran a continuación.

#### 5.4.2.1. Trastornos autoinmunitarios e inflamatorios

En la presente memoria se describe un método para tratar, prevenir y/o controlar un trastorno autoinmunitario o trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un Agente Terapéutico Antagónico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto que lo necesite. En la presente memoria se describe también un método para reducir la inflamación en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un Agente Terapéutico Antagónico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto que lo necesite. Los ejemplos no limitantes de los trastornos autoinmunitarios y los trastornos inflamatorios incluyen el rechazo de trasplantes y la enfermedad de injerto contra anfitrión (EICH). La EICH se produce cuando las células inmunitarias del donante (p. ej., las células T del donante) atacan a las células del organismo del sujeto receptor. El rechazo del trasplante se produce cuando un órgano o tejido trasplantado no logra ser aceptado por el organismo del receptor del trasplante. En general, el rechazo del trasplante se debe al sistema inmunológico del receptor (p. ej., células T del receptor) que atacan al órgano o tejido trasplantado.

En una realización específica, la administración de un Agente Terapéutico Antagónico o composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) reduce la inflamación en un sujeto en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35% , al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto a la inflamación en un sujeto al que no se ha administrado el Agente Terapéutico Antagónico utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reducción en la inflamación se puede medir mediante la reducción de la secreción de citoquinas (p. ej., Factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma). En una realización específica, la administración de un Agente Terapéutico Antagónico o composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico a un sujeto (en algunas realizaciones, un modelo animal) reduce la inflamación en un sujeto en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a la inflamación en un sujeto al que no se ha administrado el Agente Terapéutico Antagónico utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reducción de la inflamación se puede medir mediante la reducción de la secreción de citoquinas (p. ej., factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma).

En otras realizaciones, se puede administrar un Agente Terapéutico Antagónico combinado con una o más terapias diferentes para suprimir la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto. Se pueden utilizar varios agentes anti-inflamatorios conocidos en la técnica combinados con Agentes Terapéuticos Antagónicos.

Los ejemplos de los trastornos autoinmunitarios que se pueden prevenir, tratar y/o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, celiaquía (enfermedad celíaca), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, esprúe celíaco-dermatitis, síndrome de disfunción inmunológica de fatiga crónica (SFC), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioglobulinas, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, el síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso generalizado, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, tales como la vasculitis herpetiforme con dermatitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de los trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Algunos trastornos autoinmunitarios están asociados con una afección inflamatoria. De este modo existe un solapamiento entre lo que se considera un trastorno

autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunitarios se pueden caracterizar también como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de los trastornos inflamatorios que se pueden prevenir, tratar o controlar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Antagónicos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o las terapias combinadas se administran a un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. En otras realizaciones, los Agentes Terapéuticos Antagónicos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o las terapias combinadas se administran a un sujeto predispuesto a o susceptible de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un mamífero, que tiene de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un ser humano en riesgo de desarrollar de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un ser humano con una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano de 0 a 6 meses de edad, de 6 a 12 meses de edad, de 1 a 5 años de edad, de 5 a 10 años de edad, de 10 a 15 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un bebé humano o bebé humano prematuro. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un niño humano. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un adulto humano. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un humano anciano.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un animal doméstico, p. ej., un perro o un gato. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un animal de granja o ganado, p. ej., cerdos, vacas, caballos, pollos, etc.

En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un primate, preferiblemente un ser humano, u otro mamífero, tal como un cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, perro, gato y roedor, en un estado inmunocomprometido o un estado inmunodeprimido o en riesgo de convertirse en inmunocomprometido o inmunodeprimido. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que está recibiendo o se está recuperando de una terapia inmunosupresora. En ciertas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada se administran a un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer el SIDA, una infección viral, o una infección bacteriana. En ciertas realizaciones, el sujeto está, estará o ha estado sometido a cirugía, quimioterapia y/o terapia de radiación.

En algunas realizaciones, se administra a un paciente un Agente Terapéutico Antagónico, una composición que comprende un Agente Terapéutico Antagónico, o una terapia combinada antes de que se desarrolle cualquier efecto adverso o intolerancia a terapias distintas del Agente Terapéutico Antagónico. En algunas realizaciones, los Agentes Terapéuticos Antagónicos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o las terapias combinadas se administran a pacientes refractarios. En ciertas realizaciones, el paciente refractario es un paciente refractario a una terapia convencional. En ciertas realizaciones, un paciente con una enfermedad autoinmunitaria o trastorno inflamatorio, es refractario a una terapia cuando la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno inflamatorio, respectivamente, no han sido erradicados significativamente y/o los síntomas no se han aliviado significativamente. La determinación de si un paciente es refractario se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para analizar la eficacia de un tratamiento, utilizando los significados de "refractario" aceptados en la técnica en tal contexto. En diversas realizaciones, un paciente con un trastorno inflamatorio es

refractario cuando la inflamación no ha disminuido o ha aumentado.

En algunas realizaciones, Agentes Terapéuticos Antagónicos, las composiciones que comprenden los Agentes Terapéuticos Antagónicos o las terapias combinadas se administran a un paciente que es susceptible de reacciones adversas a terapias convencionales.

- 5 En algunas realizaciones, uno o más Agentes Terapéuticos Antagónicos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o terapias combinadas se administran a un paciente que ha demostrado ser refractario a terapias diferentes de los Agentes Terapéuticos Antagónicos, pero que ya no están con estas terapias. En ciertas realizaciones, los pacientes que se están controlando o tratando de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria son pacientes que ya están siendo tratados con antibióticos, agentes anti-cancerosos, agentes anti-inflamatorios, u otra terapia biológica/inmunoterapia. Entre estos pacientes son pacientes refractarios los  
10 pacientes que son demasiado jóvenes para las terapias convencionales.

- 15 En algunas realizaciones, el sujeto al que se están administrando uno o más Agentes Terapéuticos Antagónicos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o terapias combinadas no ha recibido una terapia anterior a la administración de los Agentes Terapéuticos Antagónicos, las composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o las terapias combinadas. En otras realizaciones, se administran uno o más Agentes Terapéuticos Antagónicos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o terapias combinadas a un sujeto que ha recibido una terapia antes de la administración de uno o más Agentes Terapéuticos Antagónicos, composiciones que comprenden Agentes Terapéuticos Antagónicos o terapias combinadas. En algunas realizaciones, el sujeto al que se ha administrado un Agente Terapéutico Antagónico o una composición que  
20 comprende un Agente Terapéutico Antagónico fue refractario a una terapia previa o experimentó efectos secundarios adversos a la terapia previa o la terapia previa se suspendió debido a niveles inaceptables de toxicidad en el sujeto.

#### 5.4.3. Modo de Administración

- 25 Los Agentes Terapéuticos se pueden administrar a través de cualquier ruta conocida en la técnica. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos formulados con polímeros son especialmente adecuados para la liberación local, pero tales formulaciones también pueden ser para la administración sistémica.

- 30 Los agentes terapéuticos o las composiciones de los mismos se pueden administrar por la ruta oral, o por cualquier otra ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, rectal y mucosa intestinal) y se pueden administrar junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diferentes sistemas de liberación, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, y se puede utilizar para liberar los Agentes Terapéuticos o las composiciones de los mismos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 35 Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a la aplicación parenteral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, mediante inhalación, intratumoral, o por vía tópica, particularmente en los oídos, la nariz, los ojos o la piel. El modo de administración se deja a la discreción del médico a cargo. En algunas realizaciones, la administración dará como resultado la liberación de un agente terapéutico en el torrente sanguíneo.

- 40 En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar un agente terapéutico localmente. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, aplicación tópica, p. ej., junto con un vendaje para heridas, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras.

- 45 En ciertas realizaciones, puede ser deseable introducir un agente terapéutico en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular, intratecal y epidural. La inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya.

También se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente en aerosol, o a través de perfusión en un tensioactivo pulmonar fluorocarbono o sintético.

- 50 En ciertas realizaciones, se formula un agente terapéutico en forma de supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos.

Para las infecciones virales o de melanoma con manifestaciones cutáneas, el agente terapéutico se puede administrar por vía tópica.

- 55 En otra realización, se libera un agente terapéutico en una vesícula, en particular un liposoma (Véanse Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial

infection, Lopez-Betestein y Fidler (eds.), Liss, New York, págs. 353-365 (1989); Lopez Berestein, ídem., págs. 317-327).

En otra realización, se libera un agente terapéutico en un sistema de liberación controlada (Véase, p. ej., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, más arriba, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar los ejemplos de los sistemas de liberación controlada comentados en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533. En una realización se puede utilizar una bomba (Véanse Langer, más arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (Véanse Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Véanse también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). En una realización específica, un sistema de liberación controlada que comprende un agente terapéutico se coloca en estrecha proximidad con el tejido afectado por la enfermedad que se va a prevenir, tratar y/o controlar. De acuerdo con esta realización, la estrecha proximidad del sistema de liberación controlada con el tejido afectado puede dar como resultado solamente una fracción de la dosis del agente terapéutico requerida si se éste administrara sistémicamente.

En una realización específica, el agente terapéutico formulado con un polímero se administra localmente a la zona o tejido de un paciente para potenciar o reducir la función de IL-15. En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico formulado con polímeros se puede administrar localmente a un tumor en un paciente de cáncer para potenciar o inducir la función de IL-15 y la respuesta inmunológica al tumor. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Agonístico formulado con polímeros se puede administrar localmente a un tejido infectado con un patógeno en un sujeto para potenciar o inducir la función de IL-15 y una respuesta inmunológica contra el patógeno. En ciertas realizaciones, el Agente Terapéutico Agonístico incluye el complejo de IL-15/IL-15Ra o ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra. En otras realizaciones, el Agente Terapéutico Agonístico incluye células que expresan IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades y polímeros. En una realización, las altas cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra se refieren a cantidades de complejos de IL-15/IL-15Ra expresados por las células que son al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, o más de 20 veces mayores que las cantidades de los complejos de IL-15/IL-15Ra expresados endógenamente por las células de control (p. ej., células que no han sido modificadas genéticamente para que expresen de forma recombinante IL-15, IL-15Ra, o tanto IL-15 como IL-15Ra, o células que comprenden un vector vacío).

En algunas realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico formulado con polímeros se administra localmente a un sitio de la inflamación en un sujeto que padece un trastorno autoinmunitario o inflamatorio para suprimir o reducir la función de IL-15 y la respuesta inmunológica provocada en el sitio de la inflamación. En otras realizaciones, un Agente Terapéutico Antagónico formulado con polímeros se administra localmente a un sitio de un tejido/órgano trasplantado en un sujeto para suprimir o reducir la función de IL-15 y la respuesta inmunológica al tejido trasplantado.

#### 5.4.4. Dosis y frecuencia de administración

La cantidad de un agente terapéutico, o la cantidad de una composición que comprende un agente terapéutico, que será eficaz en la prevención, tratamiento y/o control de una enfermedad que se ve afectada por la función de IL-15 se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Se pueden emplear opcionalmente análisis *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se va a utilizar dependerá también, p. ej., de la ruta de administración, del tipo de síntomas y de la gravedad de los síntomas, y se debe decidir de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente o sujeto.

En algunas realizaciones, la dosis de un agente terapéutico o composiciones de los mismos se determina extrapolando desde el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL), según se determina en estudios con animales. Esta dosificación extrapolada es útil para determinar la dosis inicial máxima recomendada para pruebas clínicas en seres humanos. Por ejemplo, los NOAEL se pueden extrapolar para determinar las dosificaciones equivalentes humanas (HED). Típicamente, la HED se extrapola a partir de una dosificación en un animal no humano basándose en las dosis que son normalizadas para un área de superficie corporal (es decir,  $Mg/m^2$ ). En realizaciones específicas, las NOAEL se determinan en ratones, hamsters, ratas, hurones, cobayas, conejos, perros, primates, primates (monos, titíes, monos ardilla, babuinos), microcerdos o minicerdos. Para una discusión sobre el uso de los NOAEL y su extrapolación para determinar las dosis equivalentes en seres humanos, Véase Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, Julio de 2005. En una realización, se administra un agente terapéutico o una composición del mismo a una dosis que es inferior a la dosificación equivalente en seres humanos (HED) del NOAEL durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, tres meses más, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más.

En ciertas realizaciones, se puede extrapolar un régimen de dosificación para un sujeto humano a partir de estudios con modelos animales utilizando la dosis a la que mueren 10% de los animales (DL10). En general, la dosis inicial de

- una prueba clínica en Fase I se basa en un ensayo preclínico. Una medida convencional de toxicidad de un fármaco en una prueba preclínica es el porcentaje de animales que mueren a causa del tratamiento. Se encuentra en el conocimiento práctico de la técnica la correlación de la DL10 en un estudio en animales con la dosis máxima tolerada (DMT) en seres humanos, ajustada al área de superficie corporal, como una base para extrapolar una dosis de partida en seres humanos. En algunas realizaciones, la interrelación de dosificaciones para un modelo animal se puede convertir para su uso en otro animal, incluyendo seres humanos, utilizando factores de conversión (basándose en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) como describen, p. ej., Freireich et al., *Cancer Chemother Prep.*, 1966, 50:219-244. El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente a partir de la altura y el peso del paciente. Véase, p. ej., *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, N. Y., 1970, 537.
- En ciertas realizaciones, el ajuste por área de superficie corporal incluye factores del anfitrión tales como, por ejemplo, el área de superficie, el peso, el metabolismo, la distribución en el tejido, la tasa de absorción, y la tasa de excreción. Además, la ruta de administración, el uso de excipientes, y la enfermedad o virus específicos que se van a elegir como diana también son factores a tener en cuenta. En una realización, la dosis de partida conservativa convencional es aproximadamente 1/10 de la DL10 murina, a pesar de que puede ser incluso menor si otras especies (es decir, perros) fueran más sensibles al agente terapéutico. En otras realizaciones, la dosis de partida conservativa convencional es de aproximadamente 1/100, 1/95, 1/90, 1/85, 1/80, 1/75, 1/70, 1/65, 1/60, 1/55, 1/50, 1/45, 1/40, 1/35, 1/30, 1/25, 1/20, 1/15, 2/10, 3/10, 4/10, o 5/10 de la DL10 murina. En otras realizaciones, la cantidad de la dosis de partida de un agente terapéutico en un ser humano es menor que la dosis extrapolada a partir de estudios en modelos animales. En otra realización, una cantidad de dosis de partida de un agente terapéutico en un ser humano es mayor que la dosis extrapolada a partir de estudios en modelos animales. Se encuentra en el conocimiento práctico de la técnica comenzar con dosis de la composición activa a niveles relativamente bajos, y aumentar o disminuir la dosificación según sea necesario para lograr el efecto deseado con una toxicidad mínima.
- Las dosis ilustrativas de los Agentes Terapéuticos que comprenden polipéptidos o anticuerpos o composiciones de los mismos incluyen cantidades de miligramos o microgramos por kilogramo de sujeto o peso de la muestra (p. ej., de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 5 microgramos por kilogramo a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo). En realizaciones específicas, una dosis diaria es de al menos 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, o al menos 1 g.
- En una realización, la dosificación tiene una concentración de 0,01 a 5000 mM, de 1 a 300 mM, de 10 a 100 mM y de 10 mM a 1 M. En otra realización, la dosificación tiene una concentración de al menos 5  $\mu$ M, al menos 10  $\mu$ M, al menos 50  $\mu$ M, al menos 100  $\mu$ M, al menos 500  $\mu$ M, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, o al menos 500 mM.
- En una realización, la dosificación tiene una concentración de 0,01 a 5000 mM, de 1 a 300 mM, de 10 a 100 mM y de 10 mM a 1 M. En otra realización, la dosificación tiene una concentración de al menos 5  $\mu$ M, al menos 10  $\mu$ M, al menos 50  $\mu$ M, al menos 100  $\mu$ M, al menos 500  $\mu$ M, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 50 mM, al menos 100 mM, o al menos 500 mM. En una realización específica, la dosificación es de 0,25  $\mu$ g/kg o más, preferiblemente de 0,5  $\mu$ g/kg o más, 1  $\mu$ g/kg o más, 2  $\mu$ g/kg o más, 3  $\mu$ g/kg o más, 4  $\mu$ g/kg o más, 5  $\mu$ g/kg o más, 6  $\mu$ g/kg o más, 7  $\mu$ g/kg o más, 8  $\mu$ g/kg o más, 9  $\mu$ g/kg o más, o 10  $\mu$ g/kg o más, 25  $\mu$ g/kg o más, preferiblemente 50  $\mu$ g/kg o más, 100  $\mu$ g/kg o más, 250  $\mu$ g/kg o más, 500  $\mu$ g/kg o más, 1 mg/kg o más, 5 mg/kg o más, 6 mg/kg o más, 7 mg/kg o más, 8 mg/kg o más, 9 mg/kg o más, o 10 mg/kg o más de peso corporal de un paciente.
- En otra realización, la dosificación es una dosis unitaria de 5 mg, preferiblemente 10 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg o más. En otra realización, la dosificación es una dosis unitaria que oscila de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200  $\mu$ g, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 400 mg, de 250  $\mu$ g a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1000 mg.
- Las dosis ilustrativas de los Agentes Terapéuticos que comprenden los ácidos nucleicos o composiciones de los mismos incluyen 0,1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 3  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 6  $\mu$ g, 7  $\mu$ g, 8  $\mu$ g, 9  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 15  $\mu$ g, 20  $\mu$ g, 25  $\mu$ g, 30  $\mu$ g, 35  $\mu$ g, 40  $\mu$ g, 45  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, o 60  $\mu$ g de ácidos nucleicos por dosis. En una realización específica, la dosis se encuentra en el intervalo de 10 ng a 100 mg, o de 50 ng a 100 mg, o de 100 ng a 100 mg de ácidos nucleicos por dosis. En algunas realizaciones específicas, la dosis se encuentra en el intervalo de 10 pg a 100 mg, o de 50 pg a 100 mg, o de 100 pg a 100 mg, o 100 pg a 100 ng de ácidos nucleicos por dosis.
- En ciertas realizaciones, los intervalos de dosificación adecuados para la administración oral son de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 500 miligramos de un agente terapéutico, por kilogramo de peso corporal por día. En realizaciones específicas, la dosis oral es de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, de aproximadamente 0,1 miligramo a aproximadamente 75 miligramos por kilogramo de peso corporal por día o de aproximadamente 0,5 miligramos a 5 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Las cantidades de dosificación descritas en la presente memoria se refieren a las cantidades totales administradas; es decir, si se administra más de un agente terapéutico, en ese

caso, en algunas realizaciones, las dosificaciones corresponden a la cantidad total administrada. En una realización específica, las composiciones orales contienen de aproximadamente 10% a aproximadamente 95% en peso de un agente terapéutico.

5 Los Intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa (iv) son de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, de aproximadamente 0,1 miligramo a aproximadamente 35 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, y de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. En algunas realizaciones, los intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal son de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal por día a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día. Los supositorios generalmente contienen de  
10 aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 50 miligramos de un agente terapéutico por kilogramo de peso corporal por día y comprenden ingrediente activo en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% en peso.

15 Las dosificaciones recomendadas para la administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, epidural, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmica o administración por inhalación se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Las dosis adecuadas para la administración tópica incluyen dosis que se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,001 miligramos a aproximadamente 50 miligramos, dependiendo del área de administración.

20 En otra realización, se administran a un sujeto una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o una composición del mismo, en donde la cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz no es la misma para cada dosis. En otra realización, se administran a un sujeto una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o una composición del mismo, en donde la dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz administrada a dicho sujeto se incrementa en, p. ej., 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, o 50 µg/kg, según avanza el tratamiento. En otra  
25 realización, se administran a un sujeto una o más dosis de una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o composición del mismo, en donde la dosis se reduce en, p. ej., 0,01 µg/kg, 0,02 µg/kg, 0,04 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,06 µg/kg, 0,08 µg/kg, 0,1 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,25 µg/kg, 0,5 µg/kg, 0,75 µg/kg, 1 µg/kg, 1,5 µg/kg, 2 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, o 50 µg/kg, según avanza el tratamiento.

30 Para los Agentes Terapéuticos que comprenden células que expresan IL-15 e IL-15Ra en altas cantidades, el intervalo de dosificación adecuado para la administración mediante cualquier ruta de administración puede ser de al menos 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1.000, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000 o 100.000 células. En realizaciones específicas, el número de células es de al menos 100, 200, 300, 400, 500 células. En otras realizaciones, el número de células es de al menos 300, 400, 500, 700, 1.000 células. En otras realizaciones específicas más, el número de células es de al menos 700, 1.000, 5.000, 10.000 células. En algunas realizaciones, el número de células es de al menos 5.000, 10.000, 25.000, 50.000, o 100.000 células. En otra realización más, el número de células es de al menos 50.000, o 100.000 células. En otras realizaciones, el número de células es de al menos  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  o más células. En otras realizaciones, el número de células es de al menos  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ , o  $1 \times 10^7$  o más células. En algunas realizaciones, el número de células es de al menos  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o más células. En otras realizaciones, el número de células es de al menos  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  o más células. En realizaciones específicas, el número de células se encuentra entre  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ , o  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ , o  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células.

45 En ciertas realizaciones, se administran a un sujeto un agente terapéutico o composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas  
50 realizaciones para tratar a un sujeto, se administra un agente terapéutico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir los síntomas asociados con una enfermedad o trastorno en lo menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otro conocido por un experto en la técnica.

55 En ciertas realizaciones para tratar o controlar una enfermedad infecciosa, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60% , al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico  
60

Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

5 En otras realizaciones, se administra a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la replicación de un agente infeccioso en al menos 1 log, 1,5 logs, 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 3,5 logs, 4 logs, 5 logs o más con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

10 En ciertas realizaciones para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir el crecimiento del tumor o la proliferación de las células cancerosas en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inhibir o reducir el crecimiento del tumor o la proliferación de células cancerosas en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

15 En ciertas realizaciones tratar o controlar enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Antagónico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para suprimir o reducir ciertos aspectos de la función inmunológica en lo menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Antagónico o composición del mismo en una cantidad eficaz para suprimir o reducir ciertos aspectos de la función inmunológica en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

25 En ciertas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inducir o potenciar una respuesta inmunológica en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65% , al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para inducir o potenciar una respuesta inmunológica en al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, o de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica.

35 En ciertas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para incrementar o potenciar el número de linfocitos (en algunas realizaciones, en un compartimento específico del organismo diana) en al menos 20% a 25%, preferiblemente al menos 25% a 30%, al menos 30% a 35%, al menos 35% a 40%, al menos 40% a 45%, al menos 45% a 50%, al menos 50% a 55%, al menos 55% a 60%, al menos 60% a 65%, al menos 65% a 70%, al menos 70% a 75%, al menos 75% a 80%, o hasta al menos 85% con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se administran a un sujeto un Agente Terapéutico Agonístico o una composición del mismo en una cantidad eficaz para incrementar o potenciar el número de linfocitos (en algunas realizaciones, en un compartimento específico del organismo) en al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, o al menos 20 veces; o en aproximadamente de 2 a 5 veces, de 2 a 10 veces, de 5 a 10 veces, o de 5 a 20 veces con respecto a un control negativo según se determina utilizando un análisis descrito en la presente memoria u otros conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el compartimento específico del organismo diana en el que se incrementa o potencia el número de linfocitos por medio de un Agente Terapéutico Agonístico es el pulmón, estómago, corazón, riñón, hígado, intestino delgado, intestino grueso, mama, próstata o vejiga. En realizaciones concretas, el compartimento específico del organismo diana en el que se incrementa o potencia el número de linfocitos es el compartimento del organismo afectado por una enfermedad o trastorno (p. ej., cáncer o enfermedad infecciosa). En algunas realizaciones, el compartimento específico del organismo diana en el que se incrementa o potencia el número de linfocitos es el ganglio linfático, bazo, o sangre periférica.

En ciertas realizaciones, se administra una dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo a un sujeto cada día, en días alternos, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, o una vez cada dos semanas. En otras realizaciones, se administran dos, tres o cuatro dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo a un sujeto cada día, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana o una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, se administran una o varias dosis de un agente terapéutico o una composición del mismo durante 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días, o 21 días. En ciertas realizaciones, se administra una dosis de un agente terapéutico o composición del mismo durante 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 2,5 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más.

Las dosificaciones de los agentes profilácticos o terapéuticos que han sido o están siendo utilizadas en la actualidad para la prevención, tratamiento y/o control de una enfermedad o trastorno que se ve afectado por la función/señalización de IL-15, p. ej., cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria, y rechazo de trasplantes, se pueden determinar utilizando referencias disponibles para un médico clínico, tales como, p. ej., the Physicians' Desk Reference (61<sup>a</sup> ed. 2007). Preferiblemente, se utilizan dosificaciones más bajas que las que han sido o están siendo utilizadas actualmente para prevenir, tratar y/o controlar la enfermedad o trastorno combinadas con uno o más Agentes Terapéuticos o composiciones de los mismos.

Para los agentes que han sido aprobados para usos distintos de la prevención, el tratamiento o el control de la enfermedad o trastorno que está afectado por la función/señalización de IL-15, p. ej., cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria, y rechazo de trasplante, los intervalos de seguridad de las dosis se pueden determinar fácilmente utilizando las referencias disponibles para los médicos clínicos, tales como p. ej., the Physicians' Desk Reference (61<sup>a</sup> ed. 2007).

Los programas de administración descritos anteriormente se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no deben ser considerados limitantes. Un experto normal en la técnica entenderá fácilmente que todas las dosis están dentro del alcance de la invención.

#### 5.4.5. Terapia adicional/combinada

La presente invención proporciona un Agente Terapéutico Agonístico o una composición que comprende un Agente Terapéutico Agonístico para su uso en un método de tratamiento, prevención y/o control del cáncer en un sujeto por medio de la potenciación de la función inmunológica mediada por IL-15 en un sujeto, en donde el Agente Terapéutico Agonístico es una célula cancerosa humana irradiada que expresa de forma recombinante IL-15 humana nativa o un derivado de la misma e IL-15Ra humana nativa o un derivado del mismo. Es posible una combinación de la presente invención con otras terapias. Otras terapias que se pueden utilizar combinadas con Agentes Terapéuticos (es decir, Agentes Terapéuticos Agonísticos y Agentes Terapéuticos Antagónicos) para la prevención, tratamiento y/o control de una enfermedad que está afectada por la función/señalización de IL-15, p. ej., cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria, y rechazo de trasplantes, incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos (incluyendo péptidos cíclicos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (p. ej., nucleótidos de ADN y ARN incluyendo, pero no limitados a, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, ARNi, y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos sintéticos o moléculas inorgánicas naturales, agentes miméticos, y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Los ejemplos específicos de tales terapias incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores (p. ej., interferón), agentes antiinflamatorios (p. ej., adrenocorticoides, corticosteroides (p. ej., beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (p. ej., aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, e inhibidores de COX-2), analgésicos, antagonistas de leucotrieno (p. ej., montelukast, metilxantinas, zafirlukast y zileuton), agonistas de beta2 (p. ej., albuterol, biterol, fenoterol, isoetarina, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina formoterol, salmeterol, y salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (p. ej., bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, antihistamínicos, agentes antimaláricos (p. ej., hidroxiclороquina), agentes antivirales (p. ej., análogos de nucleósidos (p. ej., zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, y ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, y AZT) y antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomycin), bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina y antramycin (AMC)).

Cualquier terapia que se sepa que es útil, o que se ha utilizado o está siendo utilizada actualmente para la prevención, control, y/o tratamiento de una enfermedad que está afectada por la función/señalización de IL-15 se puede utilizar combinada con Agentes Terapéuticos. Véanse, p. ej., Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. et al. (eds.), 17<sup>a</sup> Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20<sup>a</sup> Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996, and Physicians' Desk Reference (61<sup>a</sup> ed. 2007) para obtener información sobre las terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) que han sido o están siendo utilizados para la prevención, tratamiento y/o la control de la enfermedad o trastorno que se ve afectado por la función/señalización de IL-15, p. ej., cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, enfermedad de injerto contra anfitrión, y rechazo al trasplante.

## 5.4.5.1. Agentes anticancerosos

Los ejemplos no limitantes de uno o más terapias diferentes que se pueden utilizar combinadas con un agente terapéutico incluyen agentes inmunomoduladores, tales como, pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos y agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitantes de los agentes quimioterapéuticos incluyen metotrexato, ciclosporina A, leflunomida, cisplatino, ifosfamida, taxanos tales como taxol y paclitaxol, inhibidores de la topoisomerasa I (p. ej., CPT-11, topotecan, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, citocalasina B, gramicidina D, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiandrastinodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y homólogos puomicina, y citoxano. Los ejemplos de los agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-receptor de células T (p. ej., anticuerpos anti-CD4 (p. ej., cM-T412 (Boehringer), IDEC-CE9.1<sup>®</sup> (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Orthoclone y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (p. ej., Nuvion (producto Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (p. ej., un producto inmunoconjugado anti-CD5 unido a ricina) anticuerpos anti-CD7 (p. ej., CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales anti-ligando de CD40 (p. ej., IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (p. ej., CAMPATH 1H (Illex)), anticuerpos anti-CD2 (p. ej., MEDI-507 (MedImmune, Inc., Publicaciones internacionales Núms. WO 02/098370 y WO 02/069904), anticuerpos anti-CD11a (p. ej., Xanelim (Genentech)), y anticuerpos anti-B7 (p. ej., IDEC-114) (IDEC)); anticuerpos anti-receptor de citoquinas (p. ej., anticuerpos anti-receptor de IFN, anticuerpos anti-receptor de IL-2 (p. ej., Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos anti-receptor de IL-4, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-receptor de IL-10, y anticuerpos anti-receptor de IL-12), anticuerpos anti-citoquinas (p. ej., anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ , anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ , anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (p. ej., ABX-IL-8 (Abgenix)), anticuerpos anti-IL-12 y anticuerpos anti-IL-23)); inmunoglobulina CTLA4; LFA-3TIP (Biogen, Publicación Internacional Núm. WO 93/08656 y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.162.432); receptores de citoquinas solubles (p. ej., el dominio extracelular de un receptor de TNF- $\alpha$  o un fragmento del mismo, el dominio extracelular de un receptor de IL-1 $\beta$  o un fragmento del mismo, y el dominio extracelular de un receptor de IL-6 o un fragmento del mismo); citoquinas o fragmentos de las mismas (p. ej., interleuquina (IL) -2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL -15, IL-23, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , interferón (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , y GM-CSF); y anticuerpos anti-citoquinas (p. ej., anticuerpos anti-IL-2, anticuerpos anti-IL-4, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-10, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ , y anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ ), y anticuerpos que se unen inmunespecíficamente a los antígenos asociados a tumores (p. ej., Herceptin<sup>®</sup>). En ciertas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones el agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de una citoquina o un factor hemapoyético tal como IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , M-CSF, G-CSF, IL-3 o eritropoyetina. En otras realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente distinto de un agente quimioterapéutico y una citoquina o un factor hemapoyético.

Los ejemplos no limitantes de los agentes anti-cancerosos que se pueden utilizar como terapias combinados con Agentes Terapéuticos, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina; hidroclicloruro de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; alretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramina; asparragina; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodopa; bicalutamida; hidroclicloruro de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; hidroclicloruro de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidroclicloruro de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; hidroclicloruro de doxorubicina; droloxifeno; citrato droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidroclicloruro de eflornitina; elsamitrucina; enloplatin; enpromato; epipropidina; hidroclicloruro de epirubicina; erbulozol; hidroclicloruro de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; hidroclicloruro de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxiridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; hidroclicloruro de gemcitabina; hidroxurea; hidroclicloruro de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleuquina II (incluyendo interleuquina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatin; hidroclicloruro de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; hidroclicloruro de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; hidroclicloruro de losoxantrona; masoprol; maitansina; hidroclicloruro de mecloretamina; acetato de meggestol; acetato de melengestrol; melfalan; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; hidroclicloruro de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; onnaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomina; pentamustina; sulfato peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfan; hidroclicloruro de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; hidroclicloruro de procarbazona; puomicina; hidroclicloruro de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; hidroclicloruro de safingol; semustina; simtraceno; esparfosato sódico; esparfosomicina; hidroclicloruro de espirogermanio; espiromustina; espiroplatin; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; hidroclicloruro de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; hidroclicloruro de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de

vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato vinepidina; sulfato vinglicinato; sulfato vinleurosina; tartrato de vinorrelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; hidrocloreto de zorrubicina. Otros fármacos anticancerosos incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; 5  
 5 ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína 1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-  
 10 CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor  
 15 derivado de cartilago; cartelesina; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalin sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos del clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziquona; didemina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenilespiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de los estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreto de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor de factor de crecimiento  
 20 insulínico-1, agonistas de interferones; interferones; interleuquinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4 -; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplacínolida; Kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreótida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombicina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; Inhibidor de la HMG-CoA reductasa (tal como, pero no limitado a, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, estatinas, simvastatina, y atorvastatina); loxorribina; lurtotecán; texafirina luteo; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrilisina; inhibidores de la metaloproteínasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; Inhibidor del MIF; mifepristona; miltefosina; milimostima; ARN de doble cadena emparejado  
 35 erróneamente; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de pared celular miobacteriana; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia basada en supresor 1 tumoral múltiple; agente anticanceroso de mostaza; micaperoxido B; extracto de pared celular de micobacterias; miraporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelinea; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citoquinas oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelipina; pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; hidrocloreto de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgales; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; producto conjugado de hemoglobina piridoxilada-polioxi-etileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de la farnesil proteína transferasa de ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; Miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos efectores; inhibidores de transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; esponjstatina 1; escualamina; inhibidores de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metiduro de tamoxifeno;

5 tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante del tiroides; etiletiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporetida; variolina B; sistema vector, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxin®; vorozol; zanoterona; zeniplatino; cilascorbo; y estimalámero de zinostatina. Otros fármacos anticancerosos son 5-fluorouracilo y leucovorina. Estos dos agentes son particularmente útiles cuando se utilizan en métodos que emplean talidomida y un inhibidor de topoisomerasa. En realizaciones específicas, el agente anti-cáncer no es un agente quimioterapéutico.

15 En otras realizaciones específicas, el agente terapéutico se puede administrar combinado con la administración de una o más terapias, tales como, pero no limitadas a agentes anti-cancerosos, tales como los descritos en la Tabla 1 con dosis convencionales. Cuando se utilizan en una terapia combinada, las dosificaciones y/o la frecuencia de administración enumeradas en la Tabla 1 se pueden reducir.

Tabla 1

Agente terapéutico	Dosis/Administración/Formulación		
hidrocloruro de doxorrubicina (Adriamicina RDF® y Adriamicina PFS®)	Intravenoso	60-75 mg/m <sup>2</sup> el Día 1	Intervalos de 21 días
hidrocloruro de epirubicina (Ellence™)	Intravenoso	100-120 mg/m <sup>2</sup> el día 1 de cada ciclo o dividido en partes iguales y administrado los días 1-8 del ciclo	Ciclos de 3-4 semanas
fluorouracilo	Intravenoso	Presentación: viales de 5 ml y 10 ml (que contienen 250 y 500 mg de fluorouracilo, respectivamente)	
docetaxel (Taxótero®)	Intravenoso	60-100 mg/m <sup>2</sup> a lo largo de 1 hora	Una vez cada 3 semanas
paclitaxel (Taxol®)	Intravenoso	175 mg/m <sup>2</sup> a lo largo de 3 horas	Cada 3 semanas para los 4 cursos (administrada sucesivamente a la quimioterapia combinada que contiene doxorrubicina)
citrato de tamoxifeno (Nolvadex®)	Oral (comprimido)	20-40 mg Las dosificaciones superiores a 20 mg deben administrarse en dosis divididas (mañana y tarde)	Diario
leucovorina cálcica para inyectables	inyección intravenosa o intramuscular	Presentación: vial de 350 mg	La dosificación resulta poco clara a partir del texto. PDR 3610
acetato de leuprolida Lupron®)	inyección subcutánea única	1 mg (0,2 mL o marca de 20 unidades)	Una vez al día
flutamida (Eulexin®)	Oral (cápsula)	50 mg (cápsulas que contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces al día a intervalos de 8 horas (dosis diaria total de 750 mg)
nilutamida (Nilandron®)	Oral (comprimido)	300 mg o 150 mg (comprimidos contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada uno)	300 mg una vez al día durante 30 días, seguido de 150 mg una vez al día

ES 2 466 916 T3

Agente terapéutico	Dosis/Administración/Formulación		
bicalutamida (Casodex <sup>®</sup> )	Oral (comprimido)	50 mg (comprimidos que contienen 50 mg de bicalutamida cada uno)	Una vez al día
progesterona	Inyectable	USP en aceite de sésamo 50 mg/ml	
cetoconazol (Nizoral <sup>®</sup> )	Crema	Crema al 2% aplicada una o dos veces al día dependiendo de los síntomas	
prednisona	Oral (comprimido)	La dosis inicial puede variar de 5 mg a 60 mg por día dependiendo de la entidad específica de la enfermedad que se está tratando.	
fosfato sódico de estramustina (Emcyt <sup>®</sup> )	Oral (cápsula)	14 mg/kg de peso corporal (es decir, una cápsula de 140 mg por cada 10 kg o 22 lb de peso corporal)	Administrado diariamente en 3 ó 4 dosis divididas
etopósido o VP-16	Intravenoso	5 ml de solución de 20 mg/mL (100 mg)	
dacarbazina (DTIC-Dome <sup>®</sup> )	Intravenoso	2-4,5 mg/kg	Una vez al día durante 10 días. Se puede repetir a intervalos de 4 semanas
polifeprosan 20 con implante de carmustina (BCNU) (nitrosourea) (Gliadel <sup>®</sup> )	oblea colocada en la cavidad de resección	8 obleas, cada una contiene 7,7 mg de carmustina, para un total de 61,6 mg, si el tamaño y la forma de la cavidad de resección lo permite	
cisplatino	Inyectable	[n/a en PDR 861] Presentación: solución de 1 mg/ml en viales multidosis de 50 ml y 100 ml	
mitomicina	Inyectable	suministrado en viales de 5 mg y 20 mg (que contiene 5 mg y 20 mg de mitomicina)	
gemcitabina HCl (Gemzar <sup>®</sup> )	Intravenoso	Para CPNM-2 se han investigado dos calendarios y no se ha determinado el calendario óptimo calendario de 4 semanas administración por vía intravenosa a 1000 mg/m <sup>2</sup> a lo largo de 30 minutos calendario de 3 semanas Gemzar administrado por vía intravenosa a 1250 mg/m <sup>2</sup> a lo largo de de 30 minutos	Calendario de 4 semanas días 1,8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Cisplatino por vía intravenosa a 100 mg/m <sup>2</sup> el día 1 después de la infusión de Gemzar. Calendario de 3 semanas días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. Cisplatino a una dosis de 100 mg/m <sup>2</sup> administrado por vía intravenosa después de la administración de Gemzar el día 1.

Agente terapéutico		Dosis/Administración/Formulación	
carboplatino (Paraplatino®)	Intravenoso	terapia con un solo agente: 360 mg/m <sup>2</sup> IV el día 1 (infusión durante 15 minutos o más)  Otros cálculos de dosis: Terapia combinada con ciclofosfamida, recomendaciones de ajuste de la dosis, dosificación de la fórmula, etc.	Cada 4 semanas
ifosamida (Ifex®)	Intravenoso	1,2 g/m <sup>2</sup> diario	5 días consecutivos Repetir cada 3 semanas o después de la recuperación de la toxicidad hematológica
hidrocloruro de topotecan (Hycamtin®)	Intravenoso	1,5 mg/m <sup>2</sup> mediante infusión intravenosa durante 30 minutos diarios	5 días consecutivos, comenzando el día 1 del curso de 21 días
Bisfosfonatos Pamidronato Alendronato Riseditronato	Administración intravenosa u oral con 170,1-226,8 g de agua.	60 mg o 90 mg de infusión individual durante 4-24 horas para corregir la hipercalcemia en pacientes con cáncer  5 mg/d diariamente durante 2 años y después 10 mg/d durante 9 meses para prevenir o controlar la resorción ósea.  5,0 mg para prevenir o controlar la resorción ósea.	
Lovastatina (Mevacor™)	Oral	10 - 80 mg/día en una sola dosis o dividida en dos.	

#### 5.4.5.2. Agentes Antivirales

Los agentes antivirales que se pueden usar combinados con los Agentes Terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa, e inhibidores de fusión. En una realización, el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en amantadina, fosfato de oseltamivir, rimantadina, y zanamivir. En otra realización, el agente antiviral es un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa seleccionado del grupo que consiste en delavirdina, efavirenz, y nevirapina. En otra realización, el agente antiviral es un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa seleccionado del grupo que consiste en abacavir, didanosina, emtricitabina, emtricitabina, lamivudina, estavudina, tenofovir DF, zalcitabina y zidovudina. En otra realización, el agente antiviral es un inhibidor de la proteasa seleccionado del grupo que consiste en amprenavir, atazanavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir. En otra realización, el agente antiviral es un inhibidor de la fusión, tal como enfuvirtida.

Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes antivirales para su uso combinado con Agentes Terapéuticos incluyen los siguientes: rifampicina, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (p. ej., AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (p. ej., delavirdina, efavirenz, nevirapina), inhibidores de proteasa (p. ej., amprenavir, indinavir, ritonavir y saquinavir), idoxuridina, cidofovir, aciclovir, ganciclovir, zanamivir, amantadina y palivizumab. Otros ejemplos de agentes anti-virales incluyen, pero no se limitan a acemanano; aciclovir; aciclovir sódico; adefovir, alovudina; alvircept sudotox; hidrocloruro de amantadina (SYMMETREL™); arantotina; arildona; mesilato de atevirdina; avridina; cidofovir; cipamfilina; hidrocloruro de citarabina; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxarilo; edoxudina; enviroxina; famciclovir; hidrocloruro de famotina; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; foscarnet sódico; fosfonet sódico; ganciclovir; ganciclovir sódico; idoxuridina; cetoxal; lamivudina; lobucavir; hidrocloruro de memotina; metisazona; nevirapina; fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™); penciclovir; pirodovir; ribavirina; hidrocloruro de rimantadina (FLUMADINE™); mesilato de saquinavir; hidrocloruro de somantadina; sorivudina; estatolón; estavudina; hidrocloruro de tilorona; trifluridina; hidrocloruro de valaciclovir; vidarabina; fosfato de vidarabina; fosfato sódico de vidarabina; viroxima; zalcitabina; zanamivir

(RELENZA™); zidovudina; y zinviroxima.

#### 5.4.5.3. Agentes antibacterianos

Los agentes antibacterianos, incluidos los antibióticos, que se pueden utilizar combinados con los Agentes Terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos aminoglucósidos, glicopeptídicos, antibióticos de amfenicol, antibióticos de ansamicina, cefalosporinas, cefamicinas oxazolidinonas, penicilinas, quinolonas, estreptogaminas, tetraciclinas, y análogos de los mismos. En algunas realizaciones, los antibióticos se administran combinados con un agente terapéutico para prevenir y/o tratar una infección bacteriana.

En una realización específica, los Agentes Terapéuticos se utilizan combinados con otros inhibidores de la síntesis de proteínas, incluyendo pero no limitados a, estreptomina, neomicina, eritromicina, carbomicina, y espiramicina.

En una realización, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en ampicilina, amoxicilina, ciprofloxacino, gentamicina, kanamicina, neomicina, penicilina G, estreptomina, sulfanilamida, y vancomicina. En otra realización, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste de azitromicina, cefonicida, cefotetán, cefalotina, cefamicina, clortetraciclina, claritromicina, clindamicina, cicloserina, dalfopristina, doxiciclina, eritromicina, linezolid, mupirocina, oxitetraciclina, quinupristina, rifampicina, espectinomina, y trimetoprim.

Otros ejemplos, no limitantes de agentes antibacterianos para su uso combinado con los Agentes Terapéuticos incluyen los siguientes: antibióticos aminoglucósidos (p. ej., apramicina, arbecacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomina), antibióticos de amfenicol (p. ej., azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, y tianfenicol), antibióticos de ansamicina (p. ej., rifamida y rifampicina), carbacefemos (p. ej., loracarbef), carbapenemos (p. ej., biapenemo e imipenemo), cefalosporinas (p. ej., cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (p. ej., cefbuperazona, cefmetazol, y cefminox), análogos de ácido fólico (p. ej., trimetoprim), glicopéptidos (p. ej., vancomicina), lincosamidas (p. ej., clindamicina y lincomicina), macrólidos (p. ej., azitromicina, carbomicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, y acistrato de eritromicina), monobactamas (p. ej., aztreonam, carumonam y tigemonam), nitrofuranos (p. ej., furaltadona, y cloruro de furazolio), oxacefemos (p. ej., flomoxef, y moxalactama), oxazolidinonas (p. ej., linezolid), penicilinas (p. ej., amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbencilina, floxacilina, penamcilina, penetamato hidroyoduro, penicilina o benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciquina y fencihicilina potásica), quinolonas y análogos de las mismas (p. ej., cinoxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, flumequina, grepagloxacina, levofloxacina y moxifloxacina), estreptograminas (p. ej., quinupristina y dalfopristina), sulfonamidas (p. ej., sulfametoxipirazina acetilo, bencilsulfamida, nopriilsulfamida, ftatilsulfacetamida, sulfacrisoidina, y sulfacitina), sulfonas (p. ej., diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona) y tetraciclinas (p. ej., apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina). Otros ejemplos incluyen cicloserina, mupirocina, tuberina anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, y 2,4 diaminopirimidina (p. ej., Brodimoprim).

### 5.5. Actividad Biológica

#### 5.5.1. Análisis para someter a ensayo la función del agente terapéutico

##### 5.5.1.1. Análisis basados en células

En la presente memoria se describen métodos para identificar agentes que modulan la actividad de los complejos de IL-15/IL-15Ra. La actividad de un agente se puede analizar con una línea celular sensible a IL-15, p. ej., células CTLL-2, una línea celular de linfoma de células T citotóxicas de ratón (Núm. de acceso ATCC TIB-214) o células TF1-β. Véase, p. ej., la Publicación Internacional Núm. WO 05/085282. Por ejemplo, para identificar antagonistas de la función mediada por IL-15, se puede evaluar la proliferación de células CTLL-2 o TF1-β cultivadas con un complejo de IL-15/IL-15Ra en presencia o ausencia de uno o más Agentes Terapéuticos Antagónicos (p. ej., anticuerpos) mediante análisis de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina bien conocidos en la técnica y descritos en la Publicación Internacional Núm. WO 05/085282.

Para evaluar la actividad de los Agentes Terapéuticos (p. ej., polipéptidos o ácidos nucleicos que codifican IL-15 y/o IL-15RA y las células que expresan esos polipéptidos) como agonistas, se puede evaluar la proliferación de células CTLL-2 o TF1-β cultivadas en presencia o ausencia de uno o más Agentes Terapéuticos (p. ej., Complejo de IL-15/IL-15Ra) mediante análisis de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina bien conocidos en la técnica y descritos en la Publicación Internacional Núm. WO 05/085282.

Se pueden utilizar diferentes análisis conocidos en la técnica para evaluar si un agente terapéutico potencia o suprime la función inmunológica. En un aspecto, el agente terapéutico aumenta una respuesta inmunológica que puede ser, p. ej., una respuesta de anticuerpos (respuesta humoral) o una respuesta inmunológica celular, p. ej., secreción de citoquinas (p. ej., Interferón gamma), actividad coadyuvante o citotoxicidad celular. En una realización, el aumento de la respuesta inmunológica consiste en el aumento de la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos, la función efectora, la proliferación de células T, y/o la proliferación de células NK. Diversos análisis para medir estas actividades son bien conocidos en la técnica, y las descripciones ilustrativas de tales análisis se

proporcionan a continuación.

Por ejemplo, los análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) son bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en la sección 2.1 de *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc. 1997. Se puede utilizar un ELISA, p. ej., para analizar la cantidad o concentración de polipéptido IL-15 o IL-15Ra.

En otro método, se puede utilizar el análisis de "tinción de tetrámeros" (Altman et al, 1996, *Science* 274: 94-96) para identificar las células T específicas de antígenos y para evaluar cómo los Agentes Terapéuticos modulan (p. ej., potencian o suprimen) las respuestas de células T específicas de antígeno. Por ejemplo, una molécula del MHC que contiene un antígeno peptídico específico, tal como un antígeno específico de un tumor, se multimeriza para elaborar tetrámeros de péptidos solubles y se marca, por ejemplo, mediante complejación con estreptavidina. El complejo MHC-antígeno peptídico se mezcla a continuación con una población de células T obtenidas de un sujeto al que se ha administrado una composición inmunogénica sola o combinada con un agente terapéutico. La biotina se utiliza a continuación para teñir las células T que expresan el antígeno específico del tumor de interés.

Además, utilizando el análisis de cultivo mixto diana de linfocitos, la citotoxicidad de las células T se puede someter a ensayo en un análisis de liberación de <sup>51</sup>Cr como describen, p. ej., Palladino et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5074-5079. En resumen, el cultivo mixto de linfocitos se añade a una suspensión de células diana para proporcionar diferentes razones de efector:diana (E:T) (generalmente 1:1 a 40:1). Las células diana se marcan previamente incubando 1x10<sup>6</sup> células diana en medio de cultivo que contiene 500 µCi de <sup>51</sup>Cr por ml durante una hora a 37°C. Las células se lavan tres veces después del marcaje. Cada punto del análisis (razón E:T) se realiza por triplicado y se incorporan controles apropiados para medir la liberación de <sup>51</sup>Cr espontánea (sin linfocitos añadidos al análisis) y la liberación del 100% (células lisadas con detergente). Después de incubar las mezclas de células durante 4 horas, las células se sedimentan mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. La cantidad de <sup>51</sup>Cr liberada en el sobrenadante se mide mediante un contador gamma. El porcentaje de citotoxicidad se mide como las cpm de la muestra de ensayo menos las cpm liberadas espontáneamente dividido por el total de cpm liberadas por el detergente menos las cpm liberadas espontáneamente.

En otra realización, se puede utilizar un análisis ELISPOT para medir la liberación de citoquinas *in vitro* por las células T después de la administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico a un sujeto. La liberación de citoquinas es detectada por los anticuerpos que son específicos para una citoquina concreta, p. ej., Interleuquina-2, factor de necrosis tumoral y o interferón-γ (véase, p. ej., Scheibenbogen et al., 1997, *Int. J. Cancer* 71:932-936). El análisis se lleva a cabo en una placa de microtitulación que se ha recubierto previamente con un anticuerpo específico para una citoquina de interés que captura la citoquina secretada por las células T. Después de la incubación de las células T durante 24-48 horas en los pocillos recubiertos, las células T se retiran y se reemplazan por un segundo anticuerpo marcado que reconoce un epítipo diferente en la citoquina. Después de un lavado exhaustivo para eliminar el anticuerpo no unido, se añade a la placa un sustrato enzimático que produce un producto de reacción de color. El número de células productoras de citoquinas se cuenta al microscopio. Este método tiene las ventajas de tiempo de análisis corto, y sensibilidad sin la necesidad de un gran número de células T citotóxicas.

En algunos aspectos, la respuesta inmunológica inducida o potenciada por un Agente Terapéutico Agonístico se potencia o incrementa en al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, o 12 veces con respecto a la respuesta inmunitaria provocada por un control negativo según se determina mediante cualquier análisis conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunológica inducida por el Agente Terapéutico Agonístico se ve reforzada en al menos 0,5-2 veces, al menos 2-5 veces, al menos 5-10 veces, al menos 10-50 veces, al menos 50-100 veces, al menos 100-200 veces, al menos 200-300 veces, al menos 300-400 veces o al menos 400-500 veces con respecto a la respuesta inmunológica inducida por un control negativo según se analiza mediante cualquier método conocido en la técnica. En realizaciones específicas, el análisis utilizado para evaluar la respuesta inmunológicas mide el nivel de producción de anticuerpos, la producción de citoquinas, o citotoxicidad celular, y tales análisis son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el análisis utilizado para medir la respuesta inmunológica es un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que determina los niveles de anticuerpos o citoquinas, un análisis ELISPOT que determina la liberación de citoquinas, o un análisis de liberación de <sup>51</sup>Cr que determina la citotoxicidad celular.

En realizaciones específicas, el Agente Terapéutico Agonístico induce o potencia una respuesta inmunológica en un sujeto que se mide por el título de anticuerpos en el suero del sujeto, y el título de anticuerpos es de al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces mayor en comparación con el título de anticuerpos en el suero de un sujeto al que se ha administrado un control negativo. En realizaciones específicas, el título medio de anticuerpos en suero contra el antígeno en el sujeto al que se ha administrado el Agente Terapéutico Agonístico se incrementa en al menos 0,5-2 veces, al menos 2-5 veces, al menos 5-10 veces, al menos 10-50 veces, al menos 50-100 veces, al menos 100-200 veces, al menos 200-300 veces, al menos 300-400 veces o al menos 400-500 veces con respecto al título medio de anticuerpos en suero en el sujeto al que se ha administrado un control negativo según se determina mediante métodos bien conocidos en la técnica.

En la presente memoria se describen métodos de administración de Agentes Terapéuticos Agonísticos para inducir o

potenciar el nivel de producción o secreción de citoquinas, p. ej., interferón- $\gamma$ , (que puede ser de 0,5 a 500 veces mayor) en comparación con el nivel de producción o secreción de citoquinas en una muestra de control negativo. En realizaciones específicas, el Agente Terapéutico Agonístico induce o potencia una respuesta inmunológica que se mide por el aumento de liberación de citoquinas, y la concentración de citoquinas es de al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, de 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces mayor en comparación con la concentración de citoquinas de un control negativo. En realizaciones específicas, la concentración media de citoquinas en suero de las muestras obtenidas de un sujeto al que se ha administrado el Agente Terapéutico Agonístico se incrementa en al menos 0,5-2 veces, al menos 2-5 veces, al menos 5-10 veces, al menos 10-50 veces, al menos 50-100 veces, al menos 100-200 veces, al menos 200-300 veces, al menos 300-400 veces o al menos 400-500 veces con respecto a la concentración media de citoquinas en suero de las muestras obtenidas de un sujeto al que se ha administrado un control negativo según se determina mediante métodos bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el control negativo pueden ser muestras del sujeto antes de la administración del Agente Terapéutico Agonístico.

En realizaciones específicas, el Agente Terapéutico Agonístico induce o potencia la proliferación de células NK en un sujeto al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces más con respecto a la proliferación de células NK en un control negativo. En realizaciones específicas, el agente terapéutico induce o potencia la proliferación de células T en un sujeto al menos 0,2 a 5 veces, 5 a 20 veces, 10 a 30 veces, 20 a 50 veces, 50 a 200 veces, 100 a 500, 200 a 1000 veces, o 500 a 2000 veces más con respecto a la proliferación de células T en un control negativo según se determina mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., citometría de flujo, tinción CSFE, Incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina.

El aumento de la respuesta inmunológica de anticuerpos (humoral) o celular inducida por una cantidad eficaz del agente terapéutico se puede evaluar utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica.

Para evaluar la actividad de un Agente Terapéutico Antagónico que es un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al complejo de IL-15/IL-15Ra, se puede realizar un análisis de cultivo celular para determinar la capacidad del anticuerpo para reducir la afinidad de unión del complejo de IL -15/IL-15Ra al complejo receptor  $\beta\gamma$  expresado en la superficie de las células. Las células que expresan de forma endógena o recombinante del complejo receptor  $\beta\gamma$  se pueden utilizar en este análisis. Las células se ponen en contacto con el complejo de IL-15/IL-15Ra en la presencia o ausencia del anticuerpo del Agente Terapéutico Antagónico. El complejo de IL-15/IL-15Ra está marcado con un fluoróforo, radioisótopo, u otros marcadores de detección, y se analiza el nivel de unión del complejo de IL-15/IL-15Ra marcado al complejo receptor  $\beta\gamma$  expresado la superficie celular de las células en presencia y ausencia del anticuerpo utilizando métodos conocidos en la técnica, p. ej., citometría de flujo y marcadores fluorescentes, u otras máquinas compatibles para detectar el marcador detectina. En una realización específica, el anticuerpo del Agente Terapéutico Antagónico reduce la cantidad de complejos de IL-15/IL-15Ra marcados que se unen al complejo receptor  $\beta\gamma$  sobre la superficie celular.

#### 5.5.1.2. Análisis *In vitro*

La identificación de anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al complejo de IL-15/IL-15Ra puede evaluarse utilizando cualquier método bien conocido en la técnica, p. ej., ELISA, co-inmunoprecipitación, análisis Biacore y análisis KinEx A.

Los análisis de unión se pueden utilizar para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a los complejos de IL-15/IL-15Ra. Los análisis de unión se pueden realizar ya sea como análisis de unión directa ya sea como análisis de unión competitiva. La unión se puede detectar utilizando análisis ELISA convencionales o de citometría de flujo convencionales. En un análisis de unión directo, el anticuerpo candidato se somete a ensayo para detectar la unión al complejo de IL-15/IL-15Ra.

Los análisis de unión competitiva, por otra parte, evalúan la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con anticuerpos conocidos u otros compuestos que se unen a los complejos de IL-15/IL-15Ra.

En un análisis de unión directa, el complejo de IL-15/IL-15Ra se pone en contacto con un anticuerpo candidato en condiciones que permiten la unión del anticuerpo candidato a los complejos de IL-15/IL-15Ra. La unión puede tener lugar en disolución o sobre una superficie sólida. Preferiblemente, el anticuerpo candidato se marca previamente para su detección. Se puede utilizar cualquier compuesto detectable para el marcaje, tal como, pero no limitado a, un compuesto luminiscente, fluorescente, o isótopo radiactivo o grupo que los contenga, o una marca no isotópica, tal como una enzima o un colorante. Después de un período de incubación suficiente para que tenga lugar la unión, la reacción se expone a condiciones y manipulaciones que eliminan el exceso de anticuerpo o el anticuerpo que no se ha unido específicamente. Típicamente, esto implica el lavado con un tampón apropiado. Finalmente, se detecta la presencia de un complejo de IL-15/IL-15Ra-anticuerpo.

En un análisis de unión competitiva, un anticuerpo candidato se evalúa para determinar su capacidad para inhibir o desplazar la unión de un anticuerpo anti-complejo de IL-15/IL-15Ra conocido (u otro compuesto) al complejo de IL-15/IL-15Ra. Un aglutinante marcado conocido del complejo de IL-15/IL-15Ra se puede mezclar con el anticuerpo candidato, y colocarlo en condiciones en las que normalmente se produciría la interacción entre ellos, con y sin la

adición del anticuerpo candidato. La cantidad de aglutinante marcado conocido del complejo de IL-15/IL-15Ra que se une al complejo de IL-15/IL-15Ra se puede comparar con la cantidad unida en presencia o ausencia del anticuerpo candidato.

- 5 En una realización, el análisis de unión se lleva a cabo con uno o más componentes inmovilizados sobre una superficie sólida para facilitar la formación y detección de complejos de antígeno-anticuerpo. En diversas realizaciones, el soporte sólido podría ser, pero no está limitado a, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, vidrio, nitrocelulosa, dextrano, nailon, poliacrilamida y agarosa. La configuración del soporte puede incluir cuentas, membranas, micropartículas, la superficie interior de un recipiente de reacción, tal como una placa de microtitulación, tubos de ensayo u otro recipiente de reacción. La inmovilización del complejo de IL-15/IL-15Ra, u
- 10 otro componente, se puede lograr por medio de uniones covalentes o no covalentes. En una realización, la unión puede ser indirecta, es decir, a través de un anticuerpo unido. En otra realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra y los controles negativos se etiquetan con un epítipo, tal como glutatión S-transferasa (GST) de modo que la unión a la superficie sólida pueda ser mediada por un anticuerpo disponible comercialmente, tal como anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).
- 15 Por ejemplo, tal análisis de unión por afinidad se puede llevar a cabo utilizando el complejo de IL-15/IL-15Ra que está inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, el componente no movilizado de la reacción de unión, en este caso el anticuerpo anti-complejo de IL-15/IL-15Ra candidato, se marca para permitir la detección. Está disponible y se puede utilizar una variedad de métodos de marcaje, tal como un compuesto luminiscente, cromóforo, fluorescente, o un isótopo radiactivo o grupo que los contenga, y marcas no isotópicas, tales como enzimas o
- 20 colorantes. En una realización, el anticuerpo candidato se marca con un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC, disponible de Sigma Chemicals, St. Louis). Tal ensayo de unión por afinidad se puede llevar a cabo utilizando el complejo de IL-15/IL-15Ra antigénico inmovilizado sobre una superficie sólida. Los anticuerpos se incuban a continuación con el antígeno y se detecta la unión específica de los anticuerpos mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, análisis Biacore, métodos ELISA, fMet y RIA.
- 25 Por último, la marca que permanece sobre la superficie sólida se puede detectar mediante cualquier método de detección conocido en la técnica. Por ejemplo, si el anticuerpo candidato se marca con un fluoróforo, se puede utilizar un fluorímetro para detectar los complejos.

30 En una realización, se añade el anticuerpo a los análisis de unión en forma de células intactas que expresan el complejo de IL-15/IL-15Ra antigénico, o membranas aisladas que contienen el complejo de IL-15/IL-15Ra. De este modo, se puede analizar la unión directa al complejo de IL-15/IL-15Ra antigénico en células intactas en cultivo o en modelos animales en presencia y ausencia del anticuerpo candidato. Un anticuerpo candidato marcado se puede mezclar con células que expresan el complejo de IL-15/IL-15Ra humano, o con extractos brutos obtenidos de tales células, y se puede añadir el anticuerpo candidato. Las membranas aisladas se pueden utilizar para identificar los anticuerpos candidato que interactúan con el complejo de IL-15/IL-15Ra. Por ejemplo, en un experimento típico en el

35 que se utilizan membranas aisladas, las células se pueden modificar genéticamente para que expresen el complejo de IL-15/IL-15Ra antigénico. Las membranas se pueden cosechar mediante técnicas convencionales y utilizar en un análisis de unión *in vitro*. El anticuerpo candidato marcado (p. ej., anticuerpo marcado fluorescente) se une a las membranas y se analiza para determinar la actividad específica; la unión específica se determina por comparación con análisis de unión realizados en presencia de anticuerpo candidato no marcado (frío) en exceso.

40 Alternativamente, el complejo de IL-15/IL-15Ra soluble se puede expresar de forma recombinante y utilizar en análisis no basados en células para identificar los anticuerpos que se unen al complejo de IL-15/IL-15Ra. Los polipéptidos de IL-15/IL-15Ra expresados recombinantemente se pueden utilizar en los análisis de escrutinio no basados en células.

45 Alternativamente, la reacción de unión se puede llevar a cabo en disolución. En este análisis, se permite que el componente marcado interactúe con su compañero o sus compañeros de unión en disolución. Si las diferencias de tamaño entre el componente marcado y su compañero o sus compañeros de unión permiten tal separación, la separación se puede lograr haciendo pasar los productos de la reacción de unión a través de un ultrafiltro cuyos poros permitir el paso del componente marcado no unido, pero no de su compañero o sus compañeros de unión o del componente marcado unido a su compañero o sus compañeros de unión. La separación también se puede lograr

50 utilizando cualquier reactivo capaz de capturar un compañero de unión del componente marcado a partir de la disolución, tal como un anticuerpo contra el compañero de unión, etcétera.

En otra realización específica, el soporte sólido es una membrana que contiene el complejo de IL-15/IL-15Ra unida a una placa de microtitulación. Los anticuerpos candidatos, por ejemplo, se pueden unir a células que expresan anticuerpos de la biblioteca cultivados en condiciones que permiten la expresión de los miembros de la biblioteca en la placa de microtitulación. Los miembros de la biblioteca que se unen al complejo de IL-15/IL-15Ra se cosechan. Tales métodos, son descritos en general a modo de ejemplo por Parmley y Smith, 1988, Gene, 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, Biotechniques, 13:422-427; Publicación PCT Núm. WO94/18318; y en las referencias citadas anteriormente en la presente memoria.

55

Los diferentes métodos descritos anteriormente o conocidos en la técnica se pueden adaptar para analizar la afinidad de unión de los derivados de IL-15 a IL-15Ra nativo, de los derivados de IL-15Ra a IL-15 nativa, de los

60

derivados de IL-15 a los derivados de IL-15Ra, y de los complejos de IL -15/IL-15Ra al complejo receptor  $\beta\gamma$ .

### 5.5.2. Modelos Animales

Los agentes terapéuticos se analizan preferiblemente *in vivo* para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, en una realización, un agente terapéutico se puede administrar al animal al mismo tiempo que el inicio de una enfermedad o trastorno en el animal. En otra realización, un agente terapéutico se puede administrar al animal antes de la aparición de una enfermedad o trastorno en el animal. En otra realización, un agente terapéutico se puede administrar al animal después del inicio de una enfermedad o trastorno en el animal. En una realización específica, el agente terapéutico se administra al animal más de una vez. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra combinado con otra terapia.

El agente Terapéutico se puede someter a ensayo en sistemas de modelos animales, incluyendo, pero no limitados a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, cabras, ovejas, perros, conejos, cobayas, etc. En una realización específica, los Agentes Terapéuticos se someten a ensayo en un sistema de modelo de ratón. Tales sistemas de modelos son ampliamente utilizados y bien conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, se administran a un animal, tal como ratones Balb/c, hembra de seis semanas de edad ácidos nucleicos que codifican IL-15 e IL-15Ra mediante inyección hidrodinámica y se evalúan los niveles en plasma de IL-15 y/o la bioactividad de IL-15. En resumen, se inyecta a los animales (p. ej., ratones) el plásmido de IL-15 solo o combinado con el plásmido de IL-15Ra en NaCl al 0,9% estéril a través de su vena de la cola en el plazo de 7 segundos utilizando una aguja de calibre 27,5. Los ratones se sangran después de un cierto número de días (por ejemplo, el día 1 y el día 3) después de la inyección y se miden los niveles en plasma de IL-15 utilizando, p. ej., un inmunoanálisis quimioluminiscente de IL-15 (QuantiGlo, R&D Systems). Después de un cierto número de días (por ejemplo, 3 días) después de la inyección, los ratones se sacrifican y el hígado, los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos se recogen y se analizan para evaluar la bioactividad de IL-15. Para elaborar suspensiones de células individuales, los bazos se pueden comprimir suavemente a través de un colador celular de 100  $\mu\text{m}$  (Thomas) y se lavan en medio RPMI (Gibco) para eliminar cualquier estroma restante del órgano. Las células se vuelven a suspender en medio (p. ej., RPMI que contiene suero bovino fetal (FCS)) al 10% y se cuentan utilizando, p. ej., colorante Naranja de Acridina (Molecular Probes)/bromuro de etidio (Fisher). El pulmón e hígado se desmenuzan y se incuban con colagenasa (Sigma) y ADNasa (Roche) durante un período de tiempo (p. ej., 1 hora) a 37°C para elaborar suspensiones de células individuales. Las células individuales se recogen y se resuspenden en el medio (por ejemplo, RPMI completo con FCS al 10%). La bioactividad de IL-15 *in vivo* se puede medir en el hígado, pulmón y bazo utilizando citometría de flujo multicolor. En resumen, las células se lavan en tampón FACS que contiene FCS al 0,2% y se tiñen con el siguiente panel de anticuerpos anti-ratón de rata conjugados: CD3-APCCy7, CD4-PerCP, CD8-PECy7, CD44-APC, CD49b-FITC y CD62L-PE (BD Pharmingen). Las muestras se adquieren utilizando FACSaria (BD) y los datos se analizan mediante el soporte lógico FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA).

La actividad anti-cancerosa del agente terapéutico se puede determinar mediante el uso de diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer bien conocidos en la técnica como se describe, p. ej. en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teacher).

Los modelos animales para el cáncer se pueden utilizar para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un agente terapéutico. Los ejemplos no limitantes de los modelos animales para el cáncer de pulmón incluyen, pero no se limitan a, los modelos animales de cáncer de pulmón descritos por Zhang y Roth (1994, *In vivo* 8(5): 755-69) y un modelo de ratón transgénico con la función de p53 alterada (véase, p. ej., Morris et al., 1998, *J La State Med. Soc.* 150(4):179-85). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de mama incluye, pero no se limita a, un ratón transgénico que expresa en exceso la ciclina D1 (véase, p. ej., Hosokawa et al., 2001, *Transgenic Res.* 10(5):471-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer de colon incluye, pero no se limita a, un ratón con el gen TCR- $\beta$  y el gen p53 desactivados (véase, p. ej., Kado et al., 2001, *Cancer Res.* 61(6):2395-8). Los ejemplos de los modelos animales para el cáncer pancreático incluyen, pero no se limitan a, un modelo metastásico de adenocarcinoma de páncreas murino Panc02 (véase, p. ej., Wang et al., 2001, *Int J Pancreatol* 29(1):37-46) y ratones nu-nu generados en tumores pancreáticos subcutáneos (véase, p. ej., Ghaneh et al., 2001, *Gene Ther* 8(3):199-208). Los ejemplos de los modelos animales para el linfoma de no Hodgkin incluyen, pero no se limitan a, un ratón con inmunodeficiencia combinada grave ("SCID") (véase, p. ej., Bryant et al., 2000, *Lab Invest* 80(4):553-73) y un ratón transgénico IgHmu-HOX11 (véase, p. ej., Hough et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23):13853-8). Un ejemplo de un modelo animal para el cáncer esofágico incluye, pero no se limita a, un ratón transgénico para el oncogén de tipo 16 E7 del virus del papiloma humano (véase, p. ej., Herber y cols., 1996, *J. Virol* 70(3):1873-81). Los ejemplos de los modelos animales para carcinomas colorrectales incluyen, pero no se limitan a, modelos de ratones Apc (véase, p. ej., Fodde y Smits, 2001, *Trends Mol Med* 7(8):369-73 y Kuraguchi et al., 2000, *Oncogene* 19 (50):5755-63).

Para los modelos animales de enfermedades infecciosas, la eficacia de un agente terapéutico respecto a un control negativo se puede evaluar en animales infectados con virus. Las muestras obtenidas a partir de estos animales (p.

ej., suero, orina, esputo, semen, saliva, plasma o muestra de tejido) se pueden someter a ensayo para determinar la potenciación de la función inmunitaria, p. ej., la potenciación en la liberación de citoquinas, la potenciación en la producción de anticuerpos, la proliferación de células T, la proliferación de células NK, con métodos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Las muestras obtenidas a partir de estos animales (p. ej., suero, orina, esputo, semen, saliva, plasma o muestra de tejido) también se pueden someter a ensayo para determinar la reducción de la replicación viral a través de métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., aquellos que miden la replicación viral alterada (según se determina, p. ej., mediante la formación de placa) o la producción de proteínas virales (según se determina, p. ej., mediante transferencia Western, ELISA, o análisis de citometría de flujo) o ácidos nucleicos virales (según se determina, p. ej., mediante RT-PCR, análisis de transferencia northern o transferencia Southern). Para la cuantificación de virus en muestras de tejido, las muestras de tejido se homogeneizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y las diluciones de los productos homogeneizados aclarados se adsorben durante 1 hora a 37°C sobre monocapas de células (p. ej., células Vero, CEF o MDCK). En otros análisis, se llevan a cabo evaluaciones histopatológicas después de la infección, preferiblemente evaluaciones del órgano o los órganos que se sabe que el virus elige como diana para la infección. La inmunohistoquímica del virus se puede realizar utilizando un anticuerpo monoclonal específico del virus. Los modelos animales ilustrativos no limitantes descritos a continuación se pueden adaptar para otros sistemas virales.

Se pueden emplear varios modelos animales para enfermedades infecciosas que son bien conocidos en la técnica para evaluar la eficacia de agentes terapéuticos en la prevención, el tratamiento, y/o el control de enfermedades infecciosas, p. ej.: modelos de ratón de virus del herpes simple (HSV) son descritos por Crute et al., *Nature Medicine*, 2002, 8:386-391 y Bolger et al., *Antiviral Res.*, 1997, 35:157-165; modelos de cobaya de HSV son descritos por Chen y col., *Viol. J*, 23 de Nov. de 2004, 1:11; modelos animales de citomegalovirus de ratón (MCMV) y citomegalovirus humano (HCMV) son descritos por Kern et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48:4745-4753; modelos de cobaya de CMV son descritos por Bourne et al., *Antiviral Res.*, 2000, 47:103-109, Bravo et al., *Antiviral Res.*, 2003, 60:41-49 y Bravo et al., *J. Infectious Diseases*, 2006, 193:591-597; modelos animales de virus de la gripe son descritos por Sidwell et al., *Antiviral Res.*, 2000, 48:1-16; y McCauley et al., *Antiviral Res.*, 1995, 27:179-186; modelos de ratón de virus de la hepatitis B (VHB) son descritos por Cavanaugh et al., *J. Virol.*, 1997, 71:3236-3243 y Guidotti et al., *J. Virol.*, 1995, 69:6158-6169; modelos de ratón de virus de la hepatitis C (VHC) son descritos por Zhu et al., *Antimicrobial Agents and Chemother.*, 2006, 50:3260-3268, Bright et al., *Nature*, 2005, 436:973-978, Hsu et al., *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21:519-525, Ilan et al., *J. Infect. Dis.* 2002, 185:153-161, Kneteman et al., *Hepatology*, 2006, 43:1346-1353, Mercer et al., *Nat. Med.*, 2001, 7:927-933, y Wu et al., *Gastroenterology*, 2005, 128:1416-1423; modelos animales de VIH son descritos por Ayash-Rashkovsky et al., *FASEB J.*, 2005, 19:1149-1151, Mosier et al., *Semin. Immunol.*, 1996, 8:255-262, Mosier et al., *Hosp. Pract. (Off Ed.)*, 1996, 31:41-48, 53-55, 59-60, Bonyhadi et al., *Mol. Med. Today*, 1997, 3:246-253, Jolicoeur et al., *leucemia*, 1999, 13:S78-S80, Browning et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 1997, 94:14637-14641, y Sawada et al., *J. Exp. Med.*, 1998, 187:1439-1449, y Schito et al., *Curr. HIV Res.*, 2006, 4:379-386.

También se pueden utilizar otros modelos animales para infecciones virales para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un agente terapéutico, p. ej., se han desarrollado modelos animales para las infecciones virales tales como enfermedades asociadas con EBV, herpesvirus gamma, mononucleosis infecciosa, virus de la inmunodeficiencia de simio ("SIV"), infección por virus de la enfermedad de Borna, hepatitis, infección por virus de la varicela, neumonitis viral, patogénesis del virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia felina ("VIF"), infección por HTLV tipo 1, rotavirus humanos, y herpes genital (véanse, p. ej., Hayashi et al., 2002, *Histol Histopathol* 17(4):1293-310; Arico et al., 2002, *J Interferon Cytokine Res* 22(11):1081-8; Flano et al., 2002, *Immunol Res.* 25(3):201-17; Sauermann, 2001, *Curr Mol Med* 1 (4): 515-22; Pletnikov et al, 2002, *Front Biosci* 7:d593-607; Engler et al., 2001, *Mol Immunol* 38(6):457-65; White et al., 2001, *Brain Pathol* 11(4):475-9; Davis y Matalon, 2001, *News Physiol Sci* 16:185-90; Wang, 2001, *Curr Top Microbiol Immunol.* 258:201-19; Phillips et al., 2000, *J Psychopharmacol.* 14(3):244-50; Kazanji, 2000, *AIDS Res Hum retroviruses.* 16(16):1741-6; Saif et al., 1996, *Arch. Virol Supl.* 12:153-61; y Hsiung et al., 1984, *Rev. Infect Dis.* 6(1):33-50).

Otros modelos animales para las infecciones respiratorias virales incluyen, pero no se limitan a, PIV (véase, p. ej., Shephard et al, 2003 *Res. Vet Sci.* 74(2):187-190; Ottolini et al, 2002 *J Infect Dis* 186 (12):1713-1717), y RSV (véanse, p. ej., Culley et al, 2002 *J Exp Med* 196(10):1381-86; y Curtis et al, 2002 *Exp. Biol. Med.* 227(9):799-802).

El agente terapéutico, composición del mismo, o la terapia combinada que comprende el agente terapéutico se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para disminuir el curso de la infección viral.

También se pueden utilizar modelos animales para infecciones bacterianas para evaluar la eficacia de un agente terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un agente terapéutico. Se han desarrollado modelos animales de infecciones bacterianas, tales como infección por *H. pylori*, *micoplasmosis genital*, *colangitis esclerosante primaria*, *cólera*, infección pulmonar crónica con *Pseudomonas aeruginosa*, enfermedad del legionario, úlcera gastroduodenal, meningitis bacteriana, infección gástrica por *Helicobacter*, *otitis neumocócica* media, neuritis alérgica experimental, neuropatía leprosa, infección micobacteriana, endocarditis, enteritis asociada a *Aeromonas*, infección por *Bacteroides fragilis*, sífilis, endocarditis *estreptocócica*, osteomielitis hematogéna aguda, tífus de los matorrales humano, síndrome de choque tóxico, infecciones anaerobias, infecciones por *Escherichia coli*, e infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* (véanse, p. ej., Sugiyama et al., 2002, *J Gastroenterol.* 37 Suppl 13:6-9;

Brown et al., 2001, Am J Reprod Immunol. 46(3):232-41; Vierling, 2001, Best Pract Res Clin Gastroenterol. 15(4):591-610; Klose, 2000, Trends Microbiol. 8(4):189-91; Stotland et al., 2000, Pediatr Pulmonol. 30(5):413-24; Brieland et al., 2000, Immunopharmacology 48(3):249-52; Lee, 2000, Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. 14(1):75-96; Koedel & Pfister, 1999, Infect Dis Clin North Am. 13(3):549-77; Nedrud, 1999, FEMS Immunol Med Microbiol. 24(2):243-50; Prellner et al., 1999, Microb Drug Resist. 5(1):73-82; Vriesendorp, 1997, J Infect Dis. 176 Suppl 2:S164-8; Shetty y Antia, 1996, Indian J Lepr. 68(1):95-104; Balasubramanian et al., 1994, Immunobiology 191(4-5):395-401; Carbon et al., 1994, Int J Biomed Comput. 36(1-2):59-67; Haberberger et al., 1991, Experientia. 47(5):426-9; Onderdonk et al., 1990, Rev Infect Dis. 12 Suppl 2:S169-77; Wicher y Wicher, 1989, Crit Rev Microbiol. 16(3):181-234; Scheld, 1987, J Antimicrob Chemother. 20 Suppl A:71-85; Emslie y Nade, 1986, Rev Infect Dis. 8(6):841-9; Ridgway et al., 1986, Lab Anim Sci. 36(5):481-5; Quimby & Nguyen, 1985, Crit Rev Microbiol. 12(1):1-44; Onderdonk et al., 1979, Rev. Infect Dis. 1(2):291-301; Smith, 1976, Ciba Found Symp. (42):45-72, y Taylor-Robinson, 1976, Infection. 4(1 Suppl):4-8).

El agente terapéutico, composición del mismo, o la terapia combinada que comprende el agente terapéutico se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para disminuir el curso de la infección bacteriana, p. ej., una infección bacteriana respiratoria en al menos 25%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, o al menos 99% con respecto a un control negativo utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

La eficacia de los Agentes Terapéuticos, las composiciones de los mismos, o las terapias combinadas que comprenden los Agentes Terapéuticos para la prevención, el tratamiento y/o el control de una infección fúngica se puede evaluar en modelos animales para tales infecciones. Se han desarrollado modelos animales para infecciones fúngicas tales como infecciones por *Candida*, zigomicosis, *Candida mastitis*, tricosporonosis diseminada progresiva con tricosporonemia latente, candidiasis diseminada, paracoccidioidomicosis pulmonar, aspergilosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, meningitis criptocócica, meningoencefalitis coccidioidea y vasculitis cerebroespinal, infección por *Aspergillus niger*, queratitis por *Fusarium*, micosis del seno paranasal, endocarditis por *Aspergillus fumigatus*, discondroplasia tibial, vaginitis por *Candida glabrata*, candidiasis orofaríngea, enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, tinea pedis, candidiasis cutánea, placentitis micótica, tricosporonosis diseminada, aspergilosis broncopulmonar alérgica, queratitis micótica, infección por *Cryptococcus neoformans*, peritonitis fúngica, infección por *Curvularia geniculata*, endoftalmítis estafilocócica, esporotricosis, y dermatofitosis (véanse, p. ej., Arendrup et al., 2002, Infection 30(5):286-91; Kamei, 2001, Mycopathologia 152(1):5-13; Guhad et al., 2000, FEMS Microbiol Lett. 192(1):27-31; Yamagata et al., 2000, J Clin Microbiol. 38(9):32606; Andrutis et al., 2000, J Clin Microbiol. 38(6):2317-23; Cock et al., 2000, Rev Inst Med Trop Sao Paulo 42(2):59-66; Shibuya et al., 1999, Microb Pathog. 27(3):123-31; Beers et al., 1999, J Lab Clin Med. 133(5):423-33; Najvar et al., 1999, Antimicrob Agents Chemother.43(2):413-4; Williams et al., 1988, J Infect Dis. 178(4):1217-21; Yoshida, 1988, Kansenshogaku Zasshi. 1998 Jun; 72(6):621-30; Alexandrakis et al., 1998, Br J Ophthalmol. 82(3):306-11; Chakrabarti et al., 1997, J Med Vet Mycol. 35(4):295-7; Martin et al., 1997, Antimicrob Agents Chemother. 41(1):13-6; Chu et al., 1996, Avian Dis. 40(3):715-9; Fidel et al., 1996, J Infect Dis. 173(2):425-31; Cole et al., 1995, FEMS Microbiol Lett. 15;126(2):177-80; Pollock et al., 1995, Nat Genet. 9(2):202-9; Uchida et al., 1994, Jpn J Antibiot. 47(10): 1407-12; : Maebashi et al., 1994, J Med Vet Mycol. 32(5):349-59; Jensen & Schonheyder, 1993, J Exp Anim Sci. 35(4):155-60; Gokaslan y Anaissie, 1992, Infect Immun. 60(8):3339-44; Kurup et al., 1992, J Immunol. 148(12):3783-8; Singh et al., 1990, Mycopathologia. 112(3):127-37; Salkowski & Balish, 1990, Infect Immun. 58(10):3300-6; Ahmad et al., 1986, Am J Kidney Dis. 7(2):153-6; Altire-Werber E, Edberg SC, 1985, Mycopathologia. 89(2):69-73; Kane et al., 1981, Antimicrob Agents Chemother. 20(5):595-9; Barbee et al., 1977, Am J Pathol. 86(1):281-4; y Maestrone et al., 1973, Am J Vet Res. 34(6):833-6). Modelos animales para infecciones respiratorias fúngicas tales como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, aspergilosis invasiva pulmonar, *Pneumocystis carinii*, criptococosis pulmonar, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cunninghamella bertholletia* (véanse, p. ej., Aratani et al., 2002 Med Mycol 40(6):557-563; Bozza et al., 2002 Microbes Infect 4(13): 1281-1290; Kurup et al., 2002 Int Arch Allergy Immunol 129(2):129-137; Hori et al., 2002 Eur J Immuno 32(5): 1282-1291; Rivera et al., 2002 J Immuno 168(7): 3419-3427; Vassallo et al., 2001, Am J Respir Cell Mol Biol 25(2): 203-211; Wilder et al., 2002 Am J Respir Cell Mol Biol 26(3): 304-314; Yonezawa et al, 2000 J Infect Chemother 6(3): 155-161; Cacciapuoti et al., 2000 Antimicrob Agents Chemother 44(8): 2017-2022; y Honda et al., 1998 Mycopathologia 144(3):141-146).

Los Agentes Terapéuticos, las composiciones de los mismos, o las terapias combinadas que comprenden los Agentes Terapéuticos se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para reducir el curso de la infección respiratoria fúngica en al menos 25%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, o al menos 99%. Se pueden utilizar mecanismos conocidos por los expertos en la técnica para analizar la función de los Agentes Terapéuticos, las composiciones de los mismos, o las terapias combinadas que comprenden los Agentes Terapéuticos *in vivo*.

También se pueden utilizar modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de un Agente Terapéutico, una composición de mismo, o una terapia combinada que comprende un Agente Terapéutico. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso generalizado, y glomerulonefritis (Flanders et al., 1999, Autoimmunity 29:235-246; Krogh et al., 1999, Biochimie 81:511-515; Foster, 1999, Semin. Nephrol. 19:12-24).

La eficacia para prevenir, tratar y/o controlar un trastorno autoinmunitario se puede demostrar, p. ej., detectando la capacidad de un anticuerpo, una composición, o una terapia combinada descritos en la presente memoria para

reducir uno o más síntomas del trastorno autoinmunitario, para reducir los recuentos de linfocitos medios absolutos, para disminuir la activación de células T, para disminuir la proliferación de células T, o para reducir la producción de citoquinas, o para modular uno o más perfiles de citoquinas concretos. La eficacia para prevenir o tratar la psoriasis se puede demostrar, p. ej., detectando la capacidad de un Agente Terapéutico o una composición del mismo para reducir uno o más síntomas de la psoriasis, para reducir los recuentos de linfocitos medios absolutos, para reducir la producción de citoquinas, para modular uno o más perfiles de citoquinas concretos, para disminuir la descamación, para disminuir el eritema, para disminuir la elevación de las placas, para disminuir la activación de las células T en la dermis o la epidermis de una zona afectada, para disminuir la infiltración de células T a la dermis o la epidermis de una zona afectada, para reducir el PASI, para mejorar la puntuación de evaluación global del médico, o para mejorar la calidad de vida.

La actividad anti-inflamatoria de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un Agente Terapéutico se puede determinar utilizando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos por Crofford L J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También se pueden utilizar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias para evaluar la actividad anti-inflamatoria de los Agentes Terapéuticos, las composiciones de los mismos, o las terapias combinadas que comprenden los Agentes Terapéuticos.

La actividad anti-inflamatoria de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un Agente Terapéutico se puede evaluar también midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenano en la rata, utilizando una modificación del método descrito por Winter C. A. et al., en "Carrageenan Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este análisis se ha utilizado como escrutinio primario *in vivo* para determinar la actividad anti-inflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad anti-inflamatoria de las terapias de ensayo (p. ej., los Agentes Terapéuticos, las composiciones de los mismos, o las terapias combinadas que comprenden los Agentes Terapéuticos) se expresa como el porcentaje de inhibición del incremento de peso de la pata trasera del grupo de ensayo con respecto al grupo de control al que se ha administrado vehículo.

En una realización específica en la que el modelo animal experimental utilizado es el modelo de rata de artritis inducida por coadyuvante, el peso corporal se puede medir con respecto a un grupo de control para determinar la actividad anti-inflamatoria de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada.

Los modelos animales para alergias y asma son conocidos en la técnica, tal como la inflamación de flujo constante con oclusión inspiratoria final descrita por Ewart et al., 1995 *J Appl Physiol* 79(2):560-566 y otros análisis descritos, p. ej., por Komai et al., 2003 *Br J Pharmacol* 138(5): 912-920; Kenyon et al., 2003 *Toxicol Appl Pharmacol* 186(2): 90-100; Path et al., 2002 *Am J Resp & Critical Care Med* 166(6): 818-826; Martins et al., 1990 *Crit Care Med* 19:515-519; Nicolaidis et al., 1997 *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13175-13180; McLane et al., 1998 19:713-720; y Temann et al., 1998 *J Exp Med* 188 (7): 1307-1320. Por ejemplo, el modelo de transferencia adoptiva murino es un modelo animal utilizado para evaluar la eficacia de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada para la prevención, tratamiento, y/o control del asma. En el modelo de transferencia adoptiva murino, la provocación con aeroalérgeno de ratones receptores TH1 o TH2 da como resultado la migración de células efectoras TH a las vías respiratorias y se asocia con una intensa respuesta inflamatoria de la mucosa pulmonar neutrófila (TH1) y eosinófila (TH2) (Cohn et al., 1997, *J. Exp. Med.* 186:1737-1747). La hipersensibilidad de las vías respiratorias puede ser inducida en ratones por ovalbúmina (Tomkinson et al., 2001, *J. Immunol.* 166:5792-5800) o antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* (Tesciuba et al., 2001, *J. Immunol.* 167:1996-2003).

La eficacia en la prevención o el tratamiento de un trastorno inflamatorio se puede demostrar, p. ej., mediante la detección de la capacidad de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un Agente Terapéutico para reducir uno o más síntomas del trastorno inflamatorio, para disminuir la activación de células T, para disminuir la proliferación de células T, para modular uno o más perfiles de citoquinas, para reducir la producción de citoquinas, para reducir la inflamación de una articulación, órgano o tejido o para mejorar la calidad de vida.

Los cambios en la actividad de la enfermedad inflamatoria también se pueden evaluar a través los recuentos de articulaciones sensibles e hinchadas, las puntuaciones globales del paciente y del médico para el dolor y la actividad de la enfermedad, y ESR/CRP. La progresión del daño articular estructural se puede evaluar mediante la puntuación cuantitativa de rayos X de las manos, las muñecas y los pies (método de Sharp). Los cambios en el estado funcional en los seres humanos con trastornos inflamatorios se pueden evaluar mediante el Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ), y los cambios en la calidad de vida se evalúan con el SF.

La eficacia de un Agente Terapéutico, una composición del mismo, o una terapia combinada que comprende un Agente Terapéutico en la prevención, el tratamiento y/o el control de una reacción alérgica tipo I se puede evaluar por su capacidad para inducir anticuerpos anti-IgE que inhiben la unión de IgE a su receptor en los mastocitos o basófilos *in vitro*. Los niveles de IgE se pueden analizar mediante inmunoanálisis, electroforesis en gel seguida de visualización, ensayo radioinmunsorbente (RIST), ensayo radioalergoadsorbente (RAST), o cualquier otro método

conocido por los expertos en la técnica.

5.5.3. Toxicidad

5 Se pueden determinar la toxicidad y/o eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos descritos en la presente memoria mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL50/DE50. Se prefieren las terapias que muestran grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar terapias que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de liberación administración que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

10 Los datos obtenidos a partir de los análisis de cultivo celular y los estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en el método, p. ej., como se describe en la presente memoria, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de análisis de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la C150 (es decir, la concentración del Agente Terapéutico que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, p. ej., mediante cromatografía líquida de alta resolución.

15 En otra realización más, se miden las células apoptóticas tanto en compartimentos anclados como "flotantes" de los cultivos. Ambos compartimentos se recogen eliminando el sobrenadante, tripsinizando las células unidas, y combinando ambas preparaciones después de una etapa de lavado con centrifugación (10 minutos, 2000 rpm).

20 En otra realización más, la apoptosis se cuantifica midiendo la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales análisis, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados al ADN fragmentado) y los análisis basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, Núm. 2, págs. 34-37

En otra realización más, la apoptosis se puede observar morfológicamente.

30 Las líneas celulares en las que se pueden realizar tales análisis son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los análisis de apoptosis, necrosis y proliferación también se pueden realizar en células primarias, p. ej., un explante de tejido.

6. Ejemplos

35 Se transfectaron células 293 humanas con el constructo de expresión de ácido nucleico para IL-15 (véase, p. ej., la Fig. 5A-D) solo o combinado con un constructo de expresión de ácido nucleico para IL-15sRa (véase, p. ej., Fig. 7A-D) o IL-15Ra (véase, p. ej., la Fig. 6A-D) junto con un plásmido que confería resistencia a higromicina. IL15tPA indica el constructo de expresión de ácido nucleico optimizado que tiene el prepro-péptido tPA (es decir, péptido señal), que sustituye la señal de secreción de IL-15 natural. "Ra" y "SRA" indican los vectores de expresión optimizados utilizados para la expresión de IL-15Ra completo y la porción extracelular de IL-15Ra (forma soluble), respectivamente. Las células transfectadas se trataron con higromicina (250 µg/ml), y se aislaron y expandieron los focos de células resistentes de crecimiento rápido. Los sobrenadantes de los diferentes clones se analizaron para determinar la expresión de IL-15 después de 2 días en cultivo mediante ELISA (kit de ELISA para IL-15 humana Quantikine de R&D Systems). La producción de IL-15 es mayor en las células que reciben ambos genes (p = 0,0166). Se determinaron dos mediciones de IL-15 para la mayoría de los clones.

45 **Tabla 2:**

IL-15/millón de células (ng/ml)	Núm. de clon	genes
9,2	3,1	IL15tPA
14,0	3,1	IL15tPA
37,7	3,3	IL15tPA
74,0	3,3	IL15tPA

IL-15/millón de células (ng/ml)	Núm. de clon	genes
147,2	7,5	IL15tPA + SRA
136,8	6,4	IL15tPA + SRA
266,2	6,4	IL15tPA + SRA
135,9	6,5	IL15tPA + SRA
133,8	6,5	IL15tPA + SRA
184,1	6,8	IL15tPA + SRA
192,7	6,8	IL15tPA + SRA
37,5	6,9	IL15tPA + SRA
37,8	6,9	IL15tPA + SRA
101,3	7,2	IL15tPA + SRA
176,0	7,2	IL15tPA + SRA
294,5	7,21	IL15tPA + SRA
390,0	7,21	IL15tPA + SRA
81,2	4,2	IL15tPA + RA
194,2	4,2	IL15tPA + RA
54,0	4,4	IL15tPA + RA
100,8	4,4	IL15tPA + RA
18,3	5,6	IL15tPA + RA
46,2	5,6	IL15tPA + RA
31,2	5,2	IL15tPA + RA
22,5	5,2	IL15tPA + RA

5 El Clon 7.21 se cultivó adicionalmente y se seleccionó por su capacidad para crecer en medio libre de suero en matraces de sacudimiento y se seleccionó para determinar las células con capacidad de crecer en tales condiciones. En pocas palabras, los clones se cultivaron a una razón de medio de 1:1 de medio viejo (10% de suero fetal de ternera) con respecto a nuevo (sin suero) hasta que se observaron dos duplicaciones de la población. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvieron células que podrían crecer bien en medio libre de suero. El medio libre de suero utilizado fue una mezcla 1:1 de 2 medios comerciales: (i) HyClone HyQ SFM4HEK293 (Núm. de Cat. SH30521.02) y (ii) Invitrogen FreeStyle 293 (Núm. de Cat. 12338-026). El rendimiento típico de la IL-15 recombinante producida por células adaptadas para crecer en medio libre de suero en matraces de sacudimiento a partir del clon 7,21 es de aproximadamente 3 a 4 mg/L de medio y 0,6 µg/10<sup>6</sup> células, medido mediante ELISA (kit de ELISA para IL-15 humana Quantikine de R&D Systems).

10 7. Realizaciones específicas, citas y referencias

15 La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, las diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**Listado de secuencias**

5 <110> Marine Polymer Technologies, Inc.  
 The United States of America, as represented by the Secretary,  
 Department of Health and Human Services  
 Pavlakis, George N.  
 Vournakis, John N.  
 Felber, Barbara K.  
 Finkielstein, Sergio

10 <120> COMPLEJOS DE IL-1 E IL-15RALFA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 7867-070-228

15 <140>  
 <141>

<150> 60/937,471  
 <151> 2007-06-27

20 <160> 18

<170> FastSEQ para la versión de Windows 4.0

25 <210> 1  
 <211> 162  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)...(48)  
 <220>  
 <223> forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa

35 <400> 1

```

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

40 <210> 2  
 <211> 489  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> péptido señal  
 <222> (1)...(145)

ES 2 466 916 T3

<220>

<223> secuencia codificante de la forma inmadura/precursora de la IL-15 humana nativa

5 <400> 2

```

atgagaattt cgaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60
ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcartttggg ctgtttcagt 120
gcaggcttc ctaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaatt 180
gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240
cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300
gagtcgggag atgcaagtat tcatgataca gtayaaaatc tgatcatcct agcaaacac 360
agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctyggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
gaaaaaata ttaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaat gttcatcaac 480
acttcttga 489
    
```

<210> 3

10 <211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> SEÑAL

<222> (1)...(30)

<220>

20 <223> forma inmadura del receptor alfa de la IL-15 humana nativa de longitud completa

20

<400> 3

```

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
 1          5          10          15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
 20          25          30
Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Ser
 35          40          45
Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 50          55          60
Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 65          70          75          80
Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
 85          90          95
Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
 100         105         110
Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
 115         120         125
Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala
 130         135         140
Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
 145         150         155         160
Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
 165         170         175
Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
 180         185         190
Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile
 195         200         205
Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
 210         215         220
Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
 225         230         235         240
Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg
 245         250         255
Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu
 260         265
    
```

25

<210> 4

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)...(30)

5

<220>  
 <223> forma inmadura del receptor alfa de la IL-15 humana nativa soluble de longitud completa

<400> 4

10

```

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

<210>  
 <211> 304  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> Péptido señal  
 <222> (1)...(90)

20

<220>  
 <223> secuencia codificante de la forma inmadura del receptor alfa de la IL-15 humana nativa de longitud completa

25

<400> 5

```

arggccccgc ggaggggcgcg cggctgcgcg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
ctgctgctcc ggccgcgggc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggttcca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtytt gaacaaggcc 240
acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgccctggtt 300
caccaaaaggc cagcgcacc ccacacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360
agcctctccc ctcttgaaa agagcccgca gcttcattct ccagctcaaa caacacagcg 420
gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc ctccaaaatc accttcacaca 480
ggaaccacag agataagcag tcatgagtc tcccacggca ccccctctca gacaacagcc 540
aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600
cacagcgaca ccactgtggc tatctccacg tccactgtcc tgcgtgtggt gctgagcgct 660
gtgtctctcc tggcatgcta cctcaagtca aggcaaaact ccccgctggc cagcgttgaa 720
atggaagcca tggaggtct gccggtgact tgggggacca gcagcagaga tgaagacttg 780
gaaaactgct ctccaccct atga 804
    
```

<210> 6  
 <211> 615  
 <212> ADN

30

ES 2 466 916 T3

<213> Homo sapiens

<220>  
 <221> péptido señal  
 5 <222> (1)...(90)  
 <220>  
 <223> secuencia codificante de la forma inmadura del receptor alfa de la IL-15 humana nativa soluble de longitud completa

10 <400> 6

```

atggccccgc ggcgggcgcg cggetgcccg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
ctgctgctcc ggccgcgggc gacgcggggc atcacgtgcc ctcccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcggtt gaacaaggcc 240
acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgcctgggtt 300
caccaaaggc cagcgcacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360
agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gcttcatctc ccagctcaa caacacagcg 420
gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc accttccaca 480
ggaaccacag agataagcag tcatgagtc tccacggca cccctctca gacaacagcc 540
aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600
cacagcgaca ccaact                                     615

```

<210> 7  
 15 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 20 <223> sitios de escisión de proteasa heteróloga reconocidos por furina proteasa

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 3  
 25 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 7

```

Arg Xaa Xaa Arg
1

```

30 <210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> sitios de escisión de proteasa heteróloga reconocidos por trombina proteasa

<220>  
 40 <221> VARIANTE  
 <222> 1,2  
 <223> Xaa = aminoácidos hidrófobos

<220>  
 45 <221> VARIANTE  
 <222> 5,6  
 <223> Xaa = aminoácidos no ácidos

<400> 8

50 Xaa Xaa Pro Arg Xaa Xaa  
 1 5

<210> 9  
 <211> 1847  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 466 916 T3

<220>

<223> AG32 hull15opt - construcción de ácido nucleico que codifica IL-15 humana optimizada

5 <400> 9

```

uctggccatt gcatacgttg tatccatata ataataatgta catttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatgtrga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180
cgccrggctg accgcccacac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttcca 240
tagtaacgcc aatagggact tccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaatg gcccgccctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 420
ggcagtacat ctacgatta gtcacgcta ttaccatggt gatggggttt tggcagtaca 480
tcaatggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatctcc aagtctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgtrttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 600
ccgcccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctctat ataagcagag 660
ctcgttrragt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcggtc gacaagaaat ggggatctcg 780
aagccgcacc tgcggtcgat atcgatccag tgcctacctg gcctgctcct gaactcgac 840
ttcctcaagg aggcgggtat acacgtcttc atcctgggct gcttctcggc ggggtgccc 900
aagacggagg cgaactgggt gaacgtgac tcygaactga agaagatcga ggacctcctc 960
cagtcgargc acatcgacgc gacgtgttac acggagtctg acgtccaccu gtcgtgcaag 1020
gtcacggcga tgaagtgtct cctcctggag ctccaagtca tctcgtctga gtcgggggac 1080
gctgcatccc acgacacggt ggagaacctg atcactcctg cgaacaactc gctgtcgtcg 1140
aacgggaacg tcacgagtcg gggctgcaag gagtgcgagg agctggagga gaagaacatc 1200
aaggagtccc tgcagtcgtc cgtgcacatc tccagatgt tcatcaacac gtcgtgaggg 1260
cccgcgcgc cgaattcgcg yatatcggtt aacggatcca gatctyctyt gcttctagt 1320
tgcacgccat ctgtgtttt cccctcccc gtgccttctt gaccttggg aggtgccact 1380
cccactgtcc tttcctaata aatgaggaa attgcatcgc attgctgag taggtgtcat 1440
tctattctgg ggggtgggt ggggcagac agcaaggggg aggatggga agacaatagc 1500
aggaatgctg gggatcgggt gggctctatg ggtaccvagg tctgaagaa ttgaccgggt 1560
tctcctggg ccagaaagaa gcaggcacat cccctctct gtgacacacc ctgtccacgc 1620
ccctggtct tagtccagc cccactcata ggacactcat agctcaggag ggtccgcct 1680
tcaatcccac ccgctaaagt acttgagcg gtctctcct cctcctcag cccaccaaac 1740
caaacctagc ctccaagagt gggaaagaaat taaagcaaga taggctatta agtgcaagag 1800
gagagaaat gctcccaca tgtgaggaag taatgagaga aatcata 1847
    
```

10 <210> 10

<211> 162

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> AG32 hull15opt - secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana optimizada

<400> 10

```

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

20

ES 2 466 916 T3

<210> 11  
 <211> 1808  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> AG59 CMV huIL15tPA6 - construcción de ácido nucleico que codifica IL-15 humana optimizada

<400> 11

10

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatc ataatatgta ctttatatt ggctcatgtc 60
caacattacc gccatggtga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataaacttacg gtaaatggcc 180
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccccatt gacgtcaatg 360
atggtaaatg gcccgccctg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttccctactt 420
ggcagtcac ctacgatta gtcatcgta ttaccatggt gatgagggtt tggcagtaca 480
tcaatgggag tggatagcgg trtgactcac ggggatttcc aagtctcac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtacaacct 600
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggg gtgtacgggt ggaggctcat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaaccgacc agcctccgct ggcgcgcgct gacaagaaat ggatgcaatg 780
aagagagggc tctgctggtt gctgctgctg tctggagcag tcttcgtttc gccagcccag 840
gaaatccatg cccgattcag aagaggagcc agaaactggg tgaacgtgat ctgggacctg 900
aagaagatcg aggacctcat ccagtcgatg cacatcgacy cgaagctgra cacggagtct 960
gacgtccacc cgtcgtgcaa ggtcacggcg atgaaagtct tccctcctga gctccaagtc 1020
atcctcgtct agtcggggga cgcgtcgatc cacgacacgg tggagaacct gatcctctct 1080
jcgacaacct cgtctctctg gaacgggaac gtcacggagt cgggctgcaa ggagtgcgag 1140
gagctggagg agaagaacat caaggagtct ctgcagctgt tctgacacat cgtccagatg 1200
ttcatcaaca cgtcgtgagg gcccgccgct ccgaattcgc ggatctcggg taacggatcc 1260
agatctgctg tgccttctag ttgccagcca tctgttcttt gccctcccc cgtgccttcc 1320
trgacctggg aagggtgccac tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg 1380
cattgtctga gtagggtgca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 1440
gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggtctctat gggtaaccag 1500
gtgctgaaga attgaccgg ttctcctctg gccagaaaga agcaggcaca tccccctctc 1560
tgtgacacac cctgtccacg cccctggttc ttagtccag cccactcat aggacactca 1620
tagctcagga gggctccgcc ttcaatccca cccgctaaag tacttgagc ggtctctccc 1680
tccctcatca gccaccaaa ccaaacctag cctccaagag tgggaagaaa ttaaagcaag 1740
ataggctatt aagtgcagag ggagagaaaa tgcctccaac atgtgaggaa gtaatgagag 1800
aatcata 1808
    
```

<210> 12  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> AG59 CMV huIL15tPA6 - secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana optimizada

20

<400> 12

ES 2 466 916 T3

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

<210> 13

<211> 2140

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AG79 hUL15Ra - construcción de ácido nucleico que codifica IL-15Ralfa humana optimizada

10

<400> 13

cttggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta catttatatt ggctcatgtc 60  
 caacattacc gccatgrrga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120  
 ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg ghaaatggcc 180  
 cgcttggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240  
 tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacgt 300  
 cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360  
 atggtaaatg gcccgcttg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttctactctt 420  
 ggcagtacat ctacgtatta gtcategcta tcaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 480  
 tcaatggcgg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540  
 tcaatgggag tttgttttg caacaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtacaact 600  
 ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 660  
 ctctgttagt gaaccgtcag atcgcttggg gacgcctacc acgctgtttt gacctccata 720  
 gaagaccagg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgctc gacgctagca agaatggcc 780  
 ccgagccggg cgcgaggtcg ccggaccctc ggtctcccgg cgtctctact gctctgctg 840  
 ctccggccgc cgcgacgcg gggcatcacg tgcccgcgcc ccatgtccgt ggagcacgca 900  
 gacatctggg tcaagagcta cagcttgtac tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt 960  
 ttcaagcggg aggcgggcac gtcccagcct acggagtgcg tgttgaacaa ggccacgaat 1020  
 gtcgcccact ggacgacccc ctctgctcaag tgcatccgcg acccgccct ggttcaccag 1080  
 cggcccgcgc caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgcagcc ggagagcctc 1140  
 tccccgtcgg gaaaggagcc cgcgcgctcg tgcgccagct cgaacaacac ggcggccaca 1200  
 actgcagcga tcttcccggg ctcccagctg atgcccgcga agtcgcccgc cacgggaacc 1260  
 acggagatca gcagtcatga gtccctccac ggcaccccct cgcaaacgac ggccaagaac 1320  
 tgggaactca cggcgtccgc ctcccaccag ccgcccgggg tgtatccgca agccacagc 1380  
 gacaccacgg tgggatctc cacgtccacg gtctctgtgt gtgggctgag cgcggtgtcg 1440  
 ctcttggcgt gctacctcaa gtcgaggcag actccccgcg tggccagcgt tgagatggag 1500  
 gccatggagg ctctgcccgt gacgtggggg accagcagca gggatgagga cttggagaac 1560  
 tgctcgcacc acctataatg agaattcgat ccagatctgc tgtgcctct agttgccagc 1620  
 catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg 1680  
 tcccttccca ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagttagtgt cattctattc 1740  
 tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 1800  
 ctggggatgc ggtgggctct atgggtacc ccaggtctgaa gaattgacct ggttctctct 1860  
 gggcccagaa gaagcaggca catccccttc tctgtgacac accctgtcca cgcctcgtgt 1920  
 tcttagtctc agcccactc ataggacact catagctcag gagggtccg ccttcaatcc 1980  
 caccctctaa agtacttggg cgggtctctc cctccctcat cagcccacca aaccacacct 2040  
 agcctccaag agtgggaaga aattaaagca agataggcta ttaagtgcag agggagagaa 2100  
 aatgcctcca acatgtgagg aagtaatgag aqaatcata 2140

15 <210> 14

<211> 267

<212> PRT

ES 2 466 916 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AG79 hUL15Ra - secuencia de aminoácidos de la IL-15Ra humana optimizada

5

<400> 14

```

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
 1          5          10          15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
 20
Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Ser
 35          40          45
Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 50          55          60
Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 65          70          75
Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
 85          90          95
Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
 100          105          110
Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
 115          120          125
Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala
 130          135          140
Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
 145          150          155
Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
 165          170          175
Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
 180          185          190
Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile
 195          200          205
Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
 210          215          220
Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
 225          230          235
Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg
 245          250          255
Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu
 260          265

```

10

<210> 15

<211> 1971

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> AG98 CMV hu sIL15Ra - construcción de ácido nucleico que codifica IL-15Ra humana optimizada

<400> 15

20

ES 2 466 916 T3

cctggccatt gcatacgttg tatccatata ataatatgta cattedatatt ggctcatgtc 60  
 caacattacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 120  
 ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 180  
 cgcctggctg accgcccac gacccccgc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 240  
 tagtaacgcc aatagggact ttccatcgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacg 300  
 cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360  
 atggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac ttctctactt 420  
 ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatcgcggtt tggcagtaca 480  
 tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 540  
 tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaaact 600  
 ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 660  
 ctctgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgcatcc acgctgtttt gacctccata 720  
 gaagacacag ggaccgatcc agcctccgcy ggcgcgcgct gacgctagca agaaatggcc 780  
 ccgagggcgg cgcgagcgtg ccggaccctc ggtctccgg cgctgctact gctcctgctg 840  
 ctccggcccg cggcgacgcy gggcatcacg tgcccgcctc ccatgtccgt ggagcacgca 900  
 gacatctggg tcaagagcta cagcttctac tcccgggagc ggtacatctg caactcgggt 960  
 tcaagcggga aggccggcac gtccagcctg acggagrgcg tgttgaacaa ggccacgaat 1020  
 gtcgcccact ggacgacccc ctctctcaag tgcctccgcy acccggccct ggttcaccag 1080  
 cggcccgcgc caccctccac cgtaacgacg gcgggggtga ccccgcagcc ggagagcctc 1140  
 tcccctcctg gaaaggagcc cgcgcgctcg tgcgccagct cgaacaacac ggcggccaca 1200  
 actgcagcga tegtcccggg ctcccagctg atgcccgtga agtcgcccgc cacgggaacc 1260  
 acggagatca gcagtcatga gtcctcccac ggcacccctc cgcacaacgac ggccaagaac 1320  
 tgggaactca cggcgtccgc ctcccaccag ccgcccgggg tgtatccgca aggccacagc 1380  
 gacaccagct aatgagaatt cgcggatata ggttaacgga tccagatctg ctgtgccttc 1440  
 tagttgccag ccactctgtg tttgcccctc ccccgtgctt tcttgaccc tggaggtgc 1500

cactcccact gtctttctct aataaaatga ggaatttca tgcattgtc tgagttagtg 1560  
 tcattctatt ctgggggggt ggggtgggca ggcagcaag ggggaggatt gggagacaa 1620  
 tagcagcctat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtacc caggtgctga agaattgacc 1680  
 cggttcctcc tgggccagaa agaagcagcc acatcccctt ctctgtgaca caccctgtcc 1740  
 acgcccctgg tctctagctc cagcccact cataggacac tcatagctca ggagggctcc 1800  
 gccttcaate ccaccctgta aagtaacttg agcggctctc cctcccctca tcaagcccac 1860  
 aaaccaaacc tagcctccaa gagtgggaag aaattaaagc aagataggtc ataatgca 1920  
 gaggagaga aaatgctcc aacatgtgag gaagtaatga gagaatcat a 1971

<210> 16

5 <211> 205

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> AG98 CMV hu sIL15Ra - secuencia de aminoácidos de la IL-15Ra humana optimizada

<400> 16

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

ES 2 466 916 T3

<210> 17  
 <211> 1754  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5  
 <220>  
 <223> AG151 huIL-15 huGM-CSF - construcción de ácido nucleico que codifica IL-15 humana optimizada con un péptido señal de GM-CSF humano

10 <400> 17

```

cctggccatt gcatacgttg tatccatarc ataatatgta carttatatt ggcctcargtc 60
caacattacc gccatggtga cattgattat tgactagtra rtaatagtaa tcaattacgg 120
ggcattragt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 120
cgcctggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatggtccca 240

tagtaacgcc aatagggact tccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacctg 300
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 360
atggtaaatg gcccgccctgg cattatgccc agtacatgac ctatcgggac tttccractt 420
ggcagracat ctacgtarta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaaa 480
tcaatggggc tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagctctccac cccattgacg 540
tcaatgggag tttgttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgttaacaact 600
ccgccccatt gacgcaaatg gycggraggc gtgtacgggrg ggaggcttat ataagcagag 660
ctcgtttagt gaaccgctcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 720
gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg ggcgcgcgtc yacaagaaat gtggctccag 780
agcctgtac tccctgggac ggtggcctgc agcatctcga actgggtgaa cgtgatctcg 840
gacctgaaga agatcgagga cctcatccag tctatgcaca tctgacgcgac gctgtacacg 900
gagtcggacg tccaccctgc gtgcaaggte acggcgatga agtgcttctt cctggagctc 960
caagtcatct cgtctgagtc gggggacgcg tctatccacg acacgggtgga gaacctgac 1020
atcctggcga acaactcgtt gtctctgcaac gggaaactca cygagtcggg ctgcaaggag 1080
tgcgaggagc tggaggagaa gaacatcaag gagtctctgc agtcgttctg gcacatctgc 1140
cagatgttca tcaaacctgc gtgagggccc ggcgcgcga atcgcggat atcggttaa 1200
ggatccagat ctgctgctcc tctagttgc cagccatctg ttgtttgcc cccccctg 1260
ccttctctga cccctggaagg tgccaactccc actgtctctt cctaataaaa tgaggaaatt 1320
gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc 1380
aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcgggtgg ctctatgggt 1440
accaggtgc tgaagaattg acccggttcc tccctggcca gaagaagca ggcacatccc 1500
cttctctgtg acacaccctg tccaagcccc tggttcttag ttccagcccc actcatagga 1560
cactcatagc tcaggagggc tccgccttca atcccacccg ctaaagtact tggagcggtc 1620
tctccctccc tcatcagccc accaaaacca acctagcctc caagagtggg aagaaattaa 1680
agcaagatag gctattaagt gcagagggag agaaaatgcc tccaacatgt gaggaagtaa 1740
tgagagaaat cata 1754
    
```

15 <210> 18  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> AG151 huIL-15 huGM-CSF - secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana optimizada con un péptido señal de GM-CSF humano

25 <400> 18

ES 2 466 916 T3

```

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

```

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende células cancerosas humanas irradiadas modificadas genéticamente para co-expresar de manera recombinante IL-15 humana y receptor alfa de IL-15 humano ("IL-15Ra") para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto humano.
- 5 2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde las células cancerosas humanas irradiadas expresan de forma recombinante (i) IL-15 humana nativa e IL-15Ra humano nativo, (ii) un derivado de IL-15 humana e IL-15Ra humano nativo, (iii) una IL-15 humana nativa y un derivado de IL-15Ra humano o (iv) un derivado de IL-15 humana y un derivado de IL-15Ra humano; en donde dicho derivado de IL-15 humana conserva la función de la IL-15 nativa para unirse a IL-15Ra, y en donde dicho derivado de IL-15Ra humano conserva la función de IL-15Ra nativo para unirse a IL-15.
- 10 3. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde las células cancerosas humanas irradiadas expresan de forma recombinante además uno o más polipéptidos diferentes.
4. Un método para elaborar células cancerosas humanas irradiadas que expresan de forma recombinante IL-15 humana e IL-15Ra humano, en donde dicho método comprende las etapas de: (i) introducir uno o más constructos de ácido nucleico que codifican IL-15 humana nativa recombinante o un derivado de la misma e IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo en células cancerosas humanas aisladas de un sujeto, en donde dicho derivado de IL-15 humana conserva la función de la IL-15 nativa para unirse a IL-15Ra, y en donde dicho derivado de IL-15Ra humano conserva la función del IL-15Ra nativo para unirse a IL-15; y (ii) irradiar dichas células cancerosas humanas.
- 15 5. La composición para su uso de la reivindicación 1, 2, o 3, o el método de la reivindicación 4, en donde el derivado de IL-15Ra humano comprende un sitio de escisión de dominio extracelular mutado.
6. La composición para su uso de la reivindicación 1, 2, o 3, o el método de la reivindicación 4, en donde el IL-15Ra humano nativo o el derivado de IL-15Ra humano son solubles.
7. La composición para su uso de la reivindicación 1, o 2, o el método de la reivindicación 4, en donde o bien el derivado de IL-15 humana, o bien derivado de IL-15Ra humano, o ambos comprenden una molécula heteróloga.
- 25 8. La composición para su uso de la reivindicación 1, 2, o 3, o el método de la reivindicación 4, en donde la IL-15 humana nativa o el derivado de IL-15 humana están codificados por un ácido nucleico de codón optimizado.
9. La composición para su uso de la reivindicación 8 o el método de la reivindicación 8, en donde el ácido nucleico de codón optimizado comprende los SEQ ID NO: 9, 11, o 17.
- 30 10. La composición para su uso de la reivindicación 1, 2, 3, 8 o 9, o el método de la reivindicación 4, 8, o 9, en donde el IL-15Ra humano nativo o el derivado de IL-15Ra humano están codificados por un ácido nucleico de codón optimizado.
11. La composición para su uso de la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico de codón optimizado comprende los SEQ ID NO: 13 o 15.
- 35 12. Una célula cancerosa humana irradiada que expresa de forma recombinante la IL-15 humana nativa o un derivado de la misma y el IL-15Ra humano nativo o un derivado del mismo producido mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende la célula cancerosa humana irradiada de la reivindicación 12.
- 40 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde la célula cancerosa humana irradiada se formula con un polímero de poli-β-1 →4-N-acetilglucosamina.

**IL-15 humana nativa**

ATGAGAAT TTCGAAACCA CATTGAGAA GTATTTCCAT CCAGTGCTAC  
TTGTGTTTAC TTCTAAACAG TCATTTTCTA ACTGAAGCTG GCATTCATGT  
CTTCATTTTG GGCTGTTTCA GTGCAGGGCT TCCTAAAACA GAAGCCAACT  
GGTGAATGT AATAAGTGAT TTGAAAAAAA TTGAAGATCT TATTCATCT  
ATGCATATTG ATGCTACTTT ATATACGGAA AGTGATGTC ACCCCAGTTG  
CAAAGTAACA GCAATGAAGT GCTTTCTCTT GGAGTTACAA GTTATTTAC  
TTGAGTCCGG AGATGCAAGT ATTCATGATA CAGTAGAAAA TCTGATCATC  
CTAGCAAACA ACAGTTTGTC TTCTAATGGG AATGTAACAG AATCTGGATG  
CAAAGAATGT GAGGAACTGG AGGAAAAAAA TATTAAAGAA TTTTGCAGA  
GTTTTGTACA TATTGTCCAA ATGTTTCATCA ACACTTCTTG A

**Fig. 1A**

MRISKPHLRSISIOCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNV  
ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDT  
VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

**Fig. 1B**

**IL-15Ra humano nativo**

ATGGCCC GCGGCGGGCG CGCGGCTGCC GGACCCTCGG TCTCCCGGCG  
CTGCTACTGC TGCTGCTGCT CCGGCCGCGG GCGACGCGGG GCATCACGTG  
CCCTCCCCC ATGTCCGTGG AACACGCAGA CATCTGGGTC AAGAGCTACA  
 GCTTGACTC CAGGGAGCGG TACATTTGTA ACTCTGGTTT CAAGCGTAAA  
 GCCGGCACGT CCAGCCTGAC GGAGTGCCTG TTGAACAAGG CCACGAATGT  
 CGCCCACTGG ACAACCCCCA GTCTCAAATG CATTAGAGAC CCTGCCCTGG  
 TTCACCAAAG GCCAGCGCCA CCCTCCACAG TAACGACGGC AGGGGTGACC  
 CCACAGCCAG AGAGCCTCTC CCCTTCTGGA AAAGAGCCCC CAGCTTCATC  
 TCCCAGCTCA AACAACACAG CGGCCACAAC AGCAGCTATT GTCCCGGGCT  
 CCCAGTGAT GCCTTCAAAA TCACCTTCCA CAGGAACCAC AGAGATAAGC  
 AGTCATGAGT CCTCCACGG CACCCCTCT CAGACAACAG CCAAGAAGT  
 GGAACTCACA GCATCCGCCT CCCACCAGCC GCCAGGTGTG TATCCACAGG  
 GCCACAGCGA CACCACTGTG GCTATCTCCA CGTCCACTGT CCTGCTGTGT  
 GGGCTGAGCG CTGTGTCTCT CCTGGCATGC TACCTCAAGT CAAGGCAAAC  
 TCCCCCGCTG GCCAGCGTTG AAATGGAAGC CATGGAGGCT CTGCCGGTGA  
 CTTGGGGGAC CAGCAGCAGA GATGAAGACT TGGAAAAGT CTCTCACCAC  
 CTATGA

**Fig. 2A**

MAPRRARGCRTIGLPALLLLLLRPPATRGITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN  
SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQES  
LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWE  
LTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSQRTPPLASVEMEAMEA  
LPVTWGTSSRDEDELENCSHHL

**Fig. 2B**

**IL 15-Ra humano nativo soluble**

ATGGCCCC GCGGCGGGCG CGCGGCTGCC GGACCCTCGG TCTCCCGGCG  
CTGCTACTGC TGCTGCTGCT CCGGCCGCCG GCGACGCGGG GCATCACGTC  
CCCTCCCCC ATGTCCGTGG AACACGCAGA CATCTGGGTC AAGAGCTACA  
GCTTGACTC CAGGGAGCGG TACATTTGTA ACTCTGGTTT CAAGCGTAAA  
GCCGGCACGT CCAGCCTGAC GGAGTGCGTG TTGAACAAGG CCACGAATGT  
CGCCCACTGG ACAACCCCCA GTCTCAAATG CATTAGAGAC CCTGCCCTGG  
TTCACCAAAG GCCAGCGCCA CCCTCCACAG TAACGACGGC AGGGGTGACC  
CCACAGCCAG AGAGCCTCTC CCCTTCTGGA AAAGAGCCCG CAGCTTCATC  
TCCCAGCTCA AACAACACAG CGGCCACAAC AGCAGCTATT GTCCCGGGCT  
CCCAGCTGAT GCCTTCAAAA TCACCTTCCA CAGGAACCAC AGAGATAAGC  
AGTCATGAGT CCTCCCACGG CACCCCTCT CAGACAACAG CCAAGAACTG  
GGAACTCACA GCATCCGCCT CCCACCAGCC GCCAGGTGTG TATCCACAGG  
GCCACAGCGA CACCACT

**Fig. 3A**

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN  
SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQES  
LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWE  
LTASASHQPPGVYPQGHSDTT

**Fig. 3B**

AG32 huL15opt

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA  
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTG  
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG  
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC  
 CCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC  
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT  
 GGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATGACGCAATG  
 GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGAT  
 CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC  
 TCCGCGGGGcgcgcggtcgacaagaa**ATGCGGATCTCGAAGCCGCACCTGCGGTGATATCGAT**  
**CCAGTGTACCTGTGCCTGCTCCTGAACTCGCACTTCTCACGGAGGCCGGTATACACGTCT**  
**TCATCCTGGGCTGCTTCTCGGGGGGCTGCCGAAGACGGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATC**  
**TCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCCAGTCGATGCACATCGACGGACGCTGTACAC**  
**GGAGTCGGACGTCCACCCGTCGTGCAAGGTCACGGCGATGAAGTGCTTCTCCTGGAGCTCC**  
**AAGTCATCTCGCTCGAGTCGGGGGACGCGTCGATCCACGACACGGTGGAGAACCTGATCATC**  
**CTGGCGAACAACCTCGCTGTCGTGTCGAACGGGAACGTCACGGAGTCGGGCTGCAAGGAGTGCGA**  
**GGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTCGTGCACATCGTCCAGATGT**  
**TCATCAACACGTCGTGA**gggcccggcgcgcggaattcgcggatatcggttaacggatccaGA  
 TCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCCTTGAC  
 CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTC  
 TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG  
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAA  
 TTGACCCGGTTCCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTGTGACACACCT  
 GTCCACGCCCTGGTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCT  
 CCGCTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTTCCCTCCCTCATCAGCCCACC  
 AAACCAAACTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGA  
 GGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 4A

M R I S K P H L R S I S I O C Y L C L L L N S H F L T E A G I H V F I L  
 G C F S A G L P K T E A N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A  
 T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S  
 I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L E E  
 K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S •

Fig. 4B

AG32 CMVhulL15opt ORF  
(1847 pb)



Fig. 4C



AG59 CMV hull 15tPA6

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA  
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTG  
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG  
 CCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC  
 CCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC  
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT  
 GGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATG  
 GGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT  
 CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC  
 TCCGCGGgqcgqcgqcgacaagaa**ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCT**  
**GCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTCAGAAGAGGAG**  
**CCAGAACTGGGTGAACGTGATCTCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCCAGTCGATG**  
**CACATCGACCGCAGCTGTACACGGAGTCGGACGTCCACCCGTCGTGCAAGGTCACGGCGAT**  
**GAAGTGCTTCTCCTGGAGCTCCAAGTCATCTCGCTCGAGTCGGGGGACCGCTCGATCCAG**  
**ACACGGTGGGAACTGATCATCTTGGCGAACAACCTCGCTGTGCTCGAACGGGAACTGACG**  
**GAGTCGGGCTGCAAGGAGTGGGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCGATC**  
**GTTGCTGCACATCGTCCAGATGTTTCATCRAACGTCGTGA**ggggcccgqcgqcgcaattcgc  
 ggatatecggttaacggatccaGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC  
 CCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCTTAATAAAA  
 TGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC  
 AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT  
 ATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACA  
 TCCCCTTCTGTGACACACCCTGTCCAGCCCCCTGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAG  
 GACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCCTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTC  
 TCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAG  
 CAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAG  
 AGAAATCATA

Fig. 5A

MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSPS OEI HARFRGA  
 RNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS  
 CKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILA  
 NNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVH  
 IVQMFINTS•

Fig. 5B



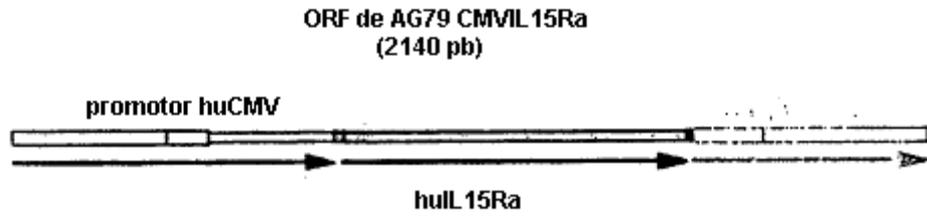
AG79 hull 15Ra

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTEGGCTCATGTCCA  
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTGC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG  
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG  
 CCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC  
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC  
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
 GGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAATG  
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT  
 CGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC  
 TCCGCGGgcgcgcgctcgacgctagcaagaaATGGCCCCGAGGGGGGGCGGAGGCTGCCGGAC  
 CCTCGGTCTCCCGGCGCTGCTACTGCTCCTGCTGCTCCGGCCGCGGGCGACGCGGGGCATCA  
 CGTGCCCGCCCCCATGTCCGTGGAGCACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTAC  
 TCCCGGGAGCGGTACATCTGCAACTCGGGTTTTCAAGCGGAAGGCCGGCACGTCCAGCCTGAC  
 GGAGTGCGTGTGAAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACGACCCCTCGCTCAAGTGCA  
 TCCGCGACCCGGCCCTGGTTCACCAGCGGCCCGCGCCACCCTCCACCGTAACGACGGCGGGG  
 GTGACCCCGCAGCCGAGAGCCTCTCCCGTCCGGGAAAGGAGCCCGCCGCGTCTGTCGCCAG  
 CTCGAACAACACGGCGGCCACAACCTGCAGCGATCGTCCCGGGCTCCAGCTGATGCCGTGCA  
 AGTCCCGCTCCACGGGAACACGGAGATCAGCAGTCATGAGTCCTCCACGGCACCCCTCCG  
 CAACGACGGCCAAGAAGTGGGAACCTACGGCGTCCGCGTCCACAGCCCGGGGGTGT  
 TCCGCAAGGCCACAGCGACACCACGGTGGCGATCTCCACGTCCACGGTCTGCTGTGTGGGC  
 TGAGCGCGGTGTGCTCCTGGCGTGTACCTCAAGTTCGAGGCGAGACTCCCGCGTGGCCAGC  
 GTTGTAGATGGAGGCCATGGAGGCTCTGCCGGTGCAGTGGGGGACCAGCAGAGGGATGAGGA  
 CTTGGAGAAGTCTCGCACCCACCTATAATGAgaattegatccaGATCTGCTGTGCCTTCTAG  
 TTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCCCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTC  
 CCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCT  
 ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA  
 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCT  
 GGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCCCTGGTTC  
 TTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCAATCCCACC  
 CGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAACCAACCTAGCCTC  
 CAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAATGCCTC  
 CAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 6A

M A P R R A R G C R T L G L P A L L L L L L R P P A T R G I T C P P  
 P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S  
 S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R D P A L V H Q R P  
 A P P S T V T T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S S P S S N N T  
 A A T T A A I V P G S Q L M P S K S P S T G T T E I S S H E S S H G T  
 P S Q T T A K N W E L T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T V A I  
 S T S T V L L C G L S A V S L L A C Y L K S R Q T P P L A S V E M E A  
 M E A L P V T W G T S S R D E D L E N C S H H L • •

Fig. 6B



**Fig. 6C**

1 CTGGCCATTSCAFAGUUTGTAAGCATATAAATAATGACATTTATATTGCTCATGTCGAACATACCGCCATG  
 75 TGACAATTATTATGACATGATTAATATATGATTAATACCGGCTATTATTTATATGCCATATAATGCAATTCGG  
 155 GTTACATAACTTACGTAATAGGCTGGCTTGGCTTATGCGCCACGACCGCCGCCAATGACATGATAAATGAGT  
 232 AATTTCTCATAGTAACGCCAATATGGAATTTCTATTTATATGATGATGAGTGGATATTACGTAATGCTGCTGCTG  
 309 GCAGTATATGATGATGATATGATATGCTAAGTATGCGCCCTATTACGTTAATATATGTAATGATGCTGCTGCTG  
 386 TGGCCAGTACATGACCTTATCGGACTTTCTACTTGGCAGTACATGACGATATTATGCTGCTTATTACCATGCTGA  
 463 TGGGCTTTGGCAGTACATGATATGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 540 GTCATGCGAATTTGTTTGGTACCCAAAATGAAAGGACTTTTCAAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 617 AATGGGCTGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 694 GGCATGCGAATTTGTTTGGTACCCAAAATGAAAGGACTTTTCAAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 771 agaa ATG GCC CCG AGG CCG CCG CCA GGC TGC CGE ACC CTC GGT CTC CCG GCG CTC CTA  
 19 M A P R R A R G C R T L G L P A L L  
 829 CTG CTC CTG CTG CTC CCG CCG CCG GCG ACG CCG GGC ATC ACG TGC CCG CCC CCC ATG  
 199 L L L L L R P P A T R G I T C P P P M  
 886 TCC GTG GAG CAC GCA SAC ATC TGG GTC AAG AGC TAC AGC TTG TAC TCC CCG GAG CCG  
 359 S V Z H A D I W V K S Y S L Y S R E R  
 943 TAC ATC TGC AAC TCG GGT TTC AAG CCG AAG GCC GGC ACG TCC AGC CTG ACG GAG TGC  
 579 Y I C H S G F K R K A G T S S L T E C  
 1008 GTG TTG AAC AAG GCC AAT ATC GGC CAC TGG ACG ACC CCC TCG CTC AAG TGC ATC  
 769 V L N K A T N V A H W T T P S L K C I  
 1057 GGC GAC CCG GCC CTG GTT CAC CAG CCG CCC GCG CCA CCC TCC ACC GTA ACG ACG GCG  
 959 R D P A L V H Q P A P P S T V T T A  
 1114 GGG GTG ACC CCG CAG CCG GAG AGC CTC TCC CCG TCG GGA AAG GAG CCC GCC CCG TCG  
 1149 G V T P Q P E S S P S G K E P A A S  
 1171 TCG CCC AGC TCG AAC AAC ACG CCG GCC ACA ACT GCA CCG ATC GTC CCG GCC TCC CAG  
 1339 S P S S N N F A A T T A A I V P E S Q  
 1228 CTG ATG CCG TCG AAG TCG CCG TCC AUG GGA ACC ACG GAG ATC AGC AGT CAT GAG TCC  
 1529 L M P S K S P S S G T T E I S S H E S  
 1285 TCC CAC GGC ACC CCC TCG CAA ACG ACG GCC AAG AAC TGG GAA ETC ACG GCG TCC GCC  
 1719 S H G T P S Q T F A K H W E L T A S A  
 1342 TCC CAC CAG CCG CCG GGG GTG TAT CCG CAA GGC CAC AGC GAC ACC ACG GTC GCG ATC  
 1909 S H Q P P G V Y P Q G H S D T T V A I  
 1399 FCC ACG TCC ACG GTC CTG CTG TGT GCG CTG AGC GCG GTC TCG CTC CTG GCG TGC TAC  
 2099 S T S T V L L C G L S A V S L L A C V  
 1456 CTC AAG TCG AGG CAG ACT CCC CCG CTG GCC AGC GTT GAG ATG GAG GCC ATG GAG GCT  
 2259 L K S R Q T P P L A S V E M E A M E A  
 1513 CTG CCG GTC ACG TGG CCG ACC AGC AGC AGG GAT GAG GAC TTG GAG AAC TGC TCG CAC  
 2479 L P V T W G S S R D E D L E N C S H  
 1570 CAG CTA TAA TGA gaattcgatcca GAT TCG CTG TCG GCG CCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG  
 2659 M \* \*  
 1630  
 1687  
 1756  
 1833  
 1910  
 1987  
 2064

Fig. 6D

**AG98 CMV hu siL15Ra**

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA  
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG  
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG  
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC  
 CCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC  
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
 GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATG  
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGAT  
 CGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC  
 TCCGCGGgqcgcgctcgacgctagcaagaaATGGCCCCGAGGCGGGCGGAGGCTGCCGGAC  
 CCTCGGTCTCCCGCGCTGCTACTGCTCCTGCTGCTCCCGCCGCGGGCAGCGGGGGCATCA  
 CGTGCCCGCCCCCATGTCCGTGAGCACGCGAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTAC  
 TCCCCGGGAGCGGTACATCTGCAACTCGGGTTTCAAGCGGAAGGCCGGCACGTCCAGCCTGAC  
 GGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCCGCCACTGGACGACCCCTCGCTCAAGTGA  
 TCCGCGACCCCGCCCTGGTTCCACGACGGCCCGCCGCCACCCCTCCACCGTAACGACGGCGGGG  
 GTGACCCCGCAGCCGAGAGCCTCTCCCGTCCGGAAAGGAGCCCGCCGCTCGTCCGCCAG  
 CTCGAACAACACGGCGGCCACAACCTGCAGCGATCGTCCCGGGCTCCAGCTGATGCCGTCGA  
 AGTCCCGCTCCACGGGAACCACGGAGATCAGCAGTCATGATCCTCCACGGCACCCCTCG  
 CAAACGACGGCCAAGAACTGGGAACCTCACGGCGTCCGCCTCCACACGCGCCGGGGGTGA  
 TCCGCAAGGCCACAGCGACACCAGTAATGAgaattcgcggatateggtaacggatccaGA  
 TCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCGTGCCTTCCCTGAC  
 CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
 TGAGTAGGTGTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG  
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAA  
 TTGACCCGGTTCCCTCGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCT  
 GTCCACGCCCTGGTTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCT  
 CCGCCTCAATCCCACCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCACC  
 AAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGA  
 GGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATA

**Fig. 7A**

M A P R R A R G C R T L G L P A L L L L L L L R P P A T R G I T C P P  
 P M S V E H A D I W V K S Y S L Y S R E R Y I C N S G F K R K A G T S  
 S L T E C V L N K A T N V A H W T T P S L K C I R D P A L V H Q R P  
 A P P S T V T T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S S P S S N N T  
 A A T T A A I V P G S Q L M P S K S P S T G T T E I S S H E S S H G T  
 P S Q T T A K N W E L T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T • •

**Fig. 7B**



AG151 hull-15 huGM-CSF

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA  
 ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC  
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAECTTACGGTAAATGGCCCGCCTG  
 GCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG  
 CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGC  
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC  
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
 GGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAATG  
 GCGGTTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCAGAT  
 CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCC  
 TCCGCGGGGcgcgcgctcgacaagaaATGTGGCTCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGC  
 CTGCAGCATCTCGAACGGGTGAACGTGATCTCGGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTCATCC  
 AGTCGATGCACATCGACGCGACGCTGTACACGGAGTCGGACGTCCACCCGTCGTGCAAGGTC  
 ACGGCGATGAAGTGCTTCTCCTGGAGCTCCAAGTCATCTCGCTCGAGTCGGGGACGCGTC  
 GATCCACGACACGGTGGAGAACCCTGATCATCCTGGCGAACAACTCGCTGTCTGTCGAACGGGA  
 ACGTCACGGAGTCGGGCTGCAAGGAGTGCAGAGGAGCTGGAGGAGAAGAATCAAGGAGTTC  
 CTGCAGTCGTTTCGTGCACATCGTCCAGATGTTTCATCAACACGTCGTCGAgggccccgcgcgc  
 gaattcgcggatatacggttaacggatccaGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG  
 TTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCC  
 TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG  
 GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG  
 TGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTCTCCTGGGCCAGAAAGAAG  
 CAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCTGGTTCTTAGTTCAGCCCC  
 ACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTG  
 GAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGA  
 AATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAA  
 GTAATGAGAGAAATCATA

Fig. 8A

MWLOSLLLLGTVAC SISNWVNVISDLKKIEDLIQS  
 MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLE  
 SGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKEC  
 EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS•

Fig. 8B

