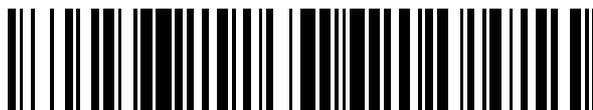


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 772**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008** **E 11178091 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2388266**

54 Título: **Moléculas de fusión y variantes de IL-15**

30 Prioridad:

11.05.2007 US 928900 P

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

24.06.2014

73 Titular/es:

**ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 North Commerce Parkway
Miramar, Florida 33025, US**

72 Inventor/es:

**WONG, HING C.;
RHODE, PETER;
ZHU, XIAOYUN y
HAN, KAI-PING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 470 772 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

Moléculas de fusión y variantes de IL-15

Antecedentes de la invención

5 Los Receptores de Células T (TCR) son efectores primarios del sistema inmunitario que tienen ventajas únicas como plataforma para desarrollar agentes terapéuticos. Si bien los agentes terapéuticos de anticuerpos se limitan al reconocimiento de patógenos en la sangre y los espacios extracelulares o a dianas proteicas sobre la superficie de la célula, los receptores de células T pueden reconocer antígenos presentados con moléculas del MHC sobre las superficies de las células (incluyendo antígenos derivados de proteínas intracelulares). Dependiendo del subtipo de células T que reconocen el antígeno presentado y se activan, los receptores de células T y las células T que albergan los receptores de células T pueden participar en el control de diversas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, las células T están implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral a través de la inducción de la diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos. Además, las células T activadas actúan iniciando las respuestas inmunitarias mediadas por células. De este modo, los receptores de células T pueden reconocer dianas adicionales no disponibles para los anticuerpos.

15 Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (células polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B y NK) constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas, las células T funcionan en la vigilancia inmunitaria y en la eliminación de antígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existe una evidencia convincente de que las células T juegan un papel principal en la causalidad y la propagación de enfermedades. En estos trastornos, el desmoronamiento de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causalidad de la enfermedad inmunitaria.

20 Se cree que los TCR juegan un papel importante en el desarrollo y la función del sistema inmunitario. Por ejemplo, se ha informado de que los TCR median la destrucción celular, incrementan la proliferación de las células B, e impactan en el desarrollo y la gravedad de diferentes trastornos incluyendo cáncer, alergias, infecciones virales y trastornos autoinmunitarios.

25 Por lo tanto sería deseable proporcionar agentes de direccionamiento novedosos basados en los receptores de las células T, así como métodos para producir y utilizar tales agentes para marcos terapéuticos y diagnósticos. Por consiguiente, sería particularmente deseable proporcionar moléculas que tuvieran ciertas ventajas en comparación con los complejos de la técnica anterior basados en el direccionamiento de anticuerpos.

30 Por otra parte, es deseable utilizar los TCR para dirigir las diferentes moléculas efectoras al sitio de la enfermedad donde pueden proporcionar beneficio terapéutico sin los efectos secundarios asociados con la actividad sistémica no dirigida. Uno de ellos es la IL-15, un miembro de la familia de linfoquinas de cuatro haces de hélices alfa. La IL-15 juega un papel multifacético en el desarrollo y el control del sistema inmunitario. Más específicamente, la IL-15 influye en la función, el desarrollo, la supervivencia, y la proliferación de las células T CD8+, las células NK, las células T asesinas, las células B, los linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) y las células presentadoras de antígenos (CPA). Se ha demostrado que los ratones transgénicos tanto IL-15^{-/-}, como IL-15Rα^{-/-} carecen de poblaciones de células T NK periféricas y asesinas, ciertos subgrupos de LIE, y la mayor parte de células T CD8+ de fenotipo de memoria, sugiriendo que la IL-15 juega un papel en el desarrollo, la proliferación o/y la supervivencia de estos tipos de células. El receptor (R) de IL-15 consiste en tres polipéptidos, el IL-15R alfa de tipo específico ("IL-15Rα" o "IL-15Ra"), el IL-2/IL-15R beta ("IL-2Rβ" o "IL-15Rb"), y la cadena gamma común ("γC," o "gC" que es compartida por múltiples receptores de citoquinas).

35 La señalización de IL-15 se puede producir a través del complejo heterotrimérico de IL-15Rα, IL-2Rβ y γC; a través del complejo heterodimérico de IL-2Rβ y γC. Un mecanismo novedoso de acción de la IL-15 es el de la transpresentación en la que la IL-15 y el IL-15Rα son expresados de manera coordinada por las células presentadoras de antígenos (monocitos y células dendríticas), y la IL-15 unida al IL-15Rα se presenta en trans a las células T Nk o CD8 próximas que expresan solamente el receptor IL-15RβγC. En cuanto al evento co-estimulador que se produce en la sinapsis inmunológica, la transpresentación de IL-15 parece ser ahora un mecanismo dominante para la acción de IL-15 in vivo y parece jugar un papel principal en la inmunovigilancia tumoral (Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601). Se ha demostrado que las subunidades de IL-2Rα soluble, que inducen isoformas que contienen una delección del exón 3 y el denominado dominio "sushi" en el extremo N, portan la mayor parte de los elementos estructurales responsables de la unión de las citoquinas. Mientras IL-2Rα solo es un receptor de baja afinidad para la IL-2 (Kd \approx 10 nM), IL-15Rα se une a IL-15 con una afinidad elevada (Kd \approx 100 pM). De este modo el IL-2Rα soluble y la IL-15 son capaces de formar complejos heterodiméricos estables en disolución y estos complejos son capaces de modular (esto es estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del complejo de IL-15R de afinidad elevada o intermedia (Mortier et al. 2006. J Biol Chem 281: 1612-1619; Stoklasek et al. 2006. J Immunol 177: 6072-6080; Rubinstein et al. 2006. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9166-9171).

El documento US 2004/253587 A1 describe antagonistas de interleuquina-15 de mamífero y muteínas de IL-15 y

moléculas de IL-15 modificadas que son capaces de unirse a la subunidad IL-15R α y que son incapaces de transducir una señal a través de las subunidades β o γ del complejo receptor de IL-15.

El documento WO 2006/063974 A2 describe una composición que comprende una matriz antigénica ordenada y repetitiva, en donde el antígeno es una proteína IL-15, una muteína de IL-15 o un fragmento de IL-15.

- 5 La entrada de la base de datos que tiene el Núm. de acceso de la base de datos 097687, procedente del Número de acceso EBI UniProt: 097687 describe la secuencia de aminoácidos de *Felis silvestris catus*. (1 de Mayo, 1999).

La entrada de la base de datos que tiene el Núm. de acceso de la base de datos Q8SPY0, procedente del Número de acceso EBI UniProt: Q8SPY0 describe la secuencia de 128 aminoácidos de la interleuquina-15 de *Canis familiaris*. (1 Junio, 2002)

- 10 La entrada de la base de datos que tiene el Núm. de acceso de la base de datos Q6B4I6, procedente del Núm. de acceso EBI UniProt: Q6B4I6 describe la secuencia de 162 aminoácidos de la interleuquina-15 de *Equus caballus*. (13 Septiembre, 2004)

Dados los efectos conocidos de la IL-15 sobre el sistema inmunitario, se han explorado numerosos enfoques basados en IL-15 para manipular el sistema inmunitario en beneficio de los anfitriones. Si bien la administración de IL-15 se ha empleado para reforzar las respuestas inmunitarias o aumentar la reconstitución del sistema inmunitario, el bloqueo de la actividad de IL-15 puede inhibir las respuestas autoinmunitarias y otras respuestas inmunitarias no deseadas (Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601). De hecho, una de las limitaciones con el tratamiento sistémico con IL-15 es la posible inducción de enfermedades autoinmunitarias. Otras limitaciones incluyen la dificultad para producir esta citoquina en sistemas de expresión de células de mamífero convencionales así como su vida media muy corta in vivo. Por lo tanto, existe la necesidad de generar una forma terapéutica inmunoestimuladora adecuada de IL-15 que presente una vida media in vivo más prolongada, un aumento de la actividad de unión a células inmunitarias, o un incremento de la bioactividad. Adicionalmente existe la necesidad de antagonistas de IL-15 eficaces. En teoría sería deseable que tales moléculas fueran dirigidas selectivamente al lugar de la enfermedad para evitar toxicidades sistémicas no deseadas y proporcionar un beneficio terapéutico más eficaz.

25 **Compendio de la invención**

La presente descripción proporciona numerosas variantes de IL-15 y complejos de proteínas de fusión solubles que tienen uso terapéutico y métodos para elaborar tales proteínas.

Las variantes de IL-15 y los complejos solubles descritos en la presente memoria tienen una utilidad terapéutica potencial.

- 30 Por consiguiente, la invención proporciona:

una variante de interleuquina 15 humana aislada (hIL-15) que comprende una sustitución de aminoácidos de N a D en la posición 72 de una secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1), en donde la variante de hIL-15 funciona como un agonista de IL-15 y tiene una mayor actividad de unión a la cadena beta/gamma del receptor de interleuquina 15 (receptores IL-15R $\beta\gamma$ C) en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo;

- 35 una variante de interleuquina 15 humana aislada (hIL-15) que comprende una sustitución de aminoácido de N a R en la posición 72 de una secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1), en donde la variante de hIL-15 funciona como un antagonista de IL-15 y tiene una menor actividad de unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma$ C en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo;

una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de IL-15 del apartado 1 o 2;

- 40 un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico del apartado 3;

una célula anfitriona que comprende el vector del apartado 4;

un método para producir la variante de IL-15 del apartado 1 o 2, comprendiendo el método: cultivar la célula anfitriona del apartado 5 en condiciones suficientes para expresar la variante de IL-15; produciendo de ese modo la variante de IL-15;

- 45 el método del apartado 6, que comprende adicionalmente la purificación de la variante de IL-15;

una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 1 para su uso en un método de estimulación de respuestas inmunitarias en un mamífero; y

una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 2 para su uso en un método de supresión de las respuestas inmunitarias en un mamífero.

- 50 En un aspecto, la invención proporciona una variante de IL-15 (también referida en la presente memoria como IL-15

mutante) que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la de la proteína IL-15 nativa (o de tipo salvaje) y que se une al polipéptido de IL-15Ra y funciona como un agonista o un antagonista de IL-15. Las realizaciones de la invención proporcionan una variante de IL-15 como una proteína no de fusión que comprende un polipéptido biológicamente activo descrito anteriormente, en donde la variante de IL-15 se utiliza en lugar del dominio de IL-15.

5 En una realización de los aspectos descritos anteriormente, la invención ofrece una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en la presente memoria.

10 En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor, una señal de inicio de la traducción, y una secuencia líder conectada operablemente a la secuencia que codifica la proteína de fusión o la variante de IL-15. En otra realización, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente está contenida en un vector de ADN.

15 En otro aspecto, la invención ofrece un método para elaborar una variante de IL-15 de los aspectos descritos anteriormente, comprendiendo el método la introducción en una célula anfitriona de un vector de ADN de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente que codifica una variante de IL-15, el cultivo de la célula anfitriona en un medio en condiciones suficientes para expresar la variante de IL-15 en la célula o el medio, la purificación de la variante de IL-15 de las células anfitrionas o el medio.

20 Adicionalmente se describe un método para destruir una célula diana, comprendiendo el método el contacto de una pluralidad de células con una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, en donde la pluralidad de células comprende adicionalmente células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R reconocidas por el dominio de IL-15 de los aspectos descritos anteriormente y las células diana que portan un antígeno reconocido por al menos uno de los polipéptidos biológicamente activos de los aspectos descritos anteriormente, la formación de un complejo de unión específico (puente) entre el antígeno sobre las células diana y las cadenas de IL-15R sobre las células inmunitarias suficiente para unir y activar las células inmunitarias, y la destrucción de las células diana por las células inmunitarias activadas unidas.

En una realización del método, las células diana son células tumorales o células infectadas viralmente.

25 En otra realización del método, el polipéptido biológicamente activo comprende un TCR.

En otra realización más del método, el antígeno sobre las células diana comprende un antígeno peptídico tumoral o codificado viralmente presentado en una molécula del MHC o HLA y reconocido por el TCR.

En una realización adicional del método, las células inmunitarias son células T, células LAK o células NK.

30 Adicionalmente se proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el que las células enfermas expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método la administración al paciente de una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad que forma un complejo de unión específico (puente) entre las células enfermas que expresan el antígeno y las células inmunitarias que expresan IL-15R suficiente para localizar las células inmunitarias, y la lesión o destrucción de las células enfermas suficiente para prevenir o tratar la enfermedad en el paciente.

35 Adicionalmente se describe un método para prevenir o tratar una enfermedad en un paciente en el cual las células del paciente expresan un antígeno asociado con la enfermedad, comprendiendo el método la administración al paciente de una variante de IL-15 de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos anteriormente, que comprende un polipéptido biológicamente activo que reconoce un antígeno asociado con la enfermedad sobre las células del paciente, la localización de la variante de IL-15 sobre las células del paciente en donde el dominio de IL-15 de la variante de IL-15 se une a las células inmunitarias que portan las cadenas de IL-15R y la supresión de la respuesta inmunitaria de las células inmunitarias.

En una realización del método, la enfermedad es un cáncer o una infección viral.

45 En otra realización del método, la enfermedad es un trastorno inmunitario, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

En otra realización del método, el antígeno asociado con la enfermedad es un complejo de péptido/MHC.

En otra realización, la invención ofrece una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 1 para su uso en un método para estimular respuestas inmunitarias en un mamífero.

50 En otra realización, la invención ofrece una cantidad eficaz de la variante de IL-15 del apartado 2 para su uso en un método de supresión de las respuestas inmunitarias en un mamífero.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 (A y B) es un dibujo esquemático. (A) es un esquema que representa un ejemplo de un

complejo de una proteína de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla. (B) es un esquema que representa constructos representativos de proteínas de fusión que comprende el complejo de la proteína de fusión.

5 La Figura 2 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa de del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15, incluyendo la secuencia líder.

10 La Figura 3 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 4 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15Ra Δ E3. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15Ra Δ E3 y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15Ra Δ E3, incluyendo la secuencia líder.

15 La Figura 5 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa un mapa del vector de expresión de pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR/huIL15RaSushi y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15RaSushi, incluyendo la secuencia líder.

20 La Figura 6 (A - C) consiste en tres paneles. (A) representa el vector de expresión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15RaSushi. (B) muestra la secuencia del gen de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15RaSushi y (C) muestra la secuencia de la proteína de fusión de c264scTCR-bisagra-huIL15RaSushi, incluyendo la secuencia líder.

La Figura 7 es un mapa del vector de expresión de pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSushi.

La Figura 8 es un mapa del vector de expresión de pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15Ra Δ E3.

25 La Figura 9 (A y B) expone la caracterización de células transfectadas que expresan la proteína de fusión de TCR/IL15Ra. (A) son dos gráficos que muestran el análisis citométrico de flujo de células que expresan la proteína de fusión. (B) es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA basado en TCR para la producción de la proteína de fusión.

30 La Figura 10 (A y B) muestra el análisis de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Ra por medio de SDS PAGE reductora. (A) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15RaSushi. (B) muestra los sobrenadantes de cultivo celular que contienen c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15Ra Δ E3.

35 La Figura 11 (A - C) muestra el análisis de TCR/IL15, TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15. (B) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15RaSushi. (C) es un gráfico que muestra el perfil de cromatografía SEC del complejo de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RaSushi.

40 La Figura 12 (A y B) es un análisis de TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión mediante cromatografía de exclusión por tamaños. (A) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC de c264scTCR/huIL15Ra Δ E3. (B) es un gráfico que ilustra el perfil de cromatografía SEC del complejo de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15Ra Δ E3.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la unión de TCR/IL15, TCR/IL15Ra y complejos de proteínas de fusión a complejos de péptido/MHC presentados sobre las células, según se determina mediante citometría de flujo.

45 La Figura 14 (A-D) consiste en cuatro paneles. (A) muestra la secuencia de la proteína IL15 humana madura (SEQ ID NO: 1) y los residuos subrayados en color azul están sustituidos en las variantes de IL-15 como se muestra en la Tabla 1. (B) muestra los vectores de expresión pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N. (C) muestra la secuencia de los genes pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N y (D) muestra la secuencia de la proteína de fusión de pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8A y pNEF38-c264scTCR-bisagra-huIL15D8N, incluyendo la secuencia líder. Los nucleótidos subrayados se cambiaron para generar las variantes de IL-15 indicadas.

La Figura 15 es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células CTLL2 portadoras de IL-15R teñidas con las proteínas y los complejos de fusión seguido del reactivo de péptido/MHC específico de TCR.

La Figura 16 (A - C) son gráficos que muestran la unión de complejos de proteínas de fusión diméricas de TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15, que comprende formas nativas y variantes de IL15, a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en células cargadas con el péptido, como se determina mediante citometría de flujo. También se muestra la unión de fondo de los complejos de proteínas de fusión diméricas en las células sin péptido cargado (A) es un gráfico que muestra la unión de los complejos diméricos de TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a complejos de péptido cognado/MHC que se presentan en las células. (B) es un gráfico que muestra la ligera unión de fondo de complejos diméricos de TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa) a las células sin péptido cargado. No se observó unión de fondo de complejos diméricos de TCR/IL15R α Sushi y variantes de TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A a las células no cargadas. (C) es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células 32D β que portan IL-15R $\beta\gamma$ C teñidas con complejos dímeros de TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15wt (forma nativa), o variantes de TCR/IL15N72D, TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A. Se observó el aumento de la unión a IL-15R $\beta\gamma$ C del complejo que contenía TCR/IL15N72D y la disminución de la unión a IL-15R $\beta\gamma$ C de los complejos que contenían TCR/IL15D8N o TCR/IL15D8A.

La Figura 17 (A y B) son gráficos que muestran las actividades de unión de proteínas de fusión de TCR/IL15, antagonistas, y agonistas de tipo amplio a complejos de péptidos cognados/MHC e IL15R α según se determina mediante ELISA. (A) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a complejos de péptidos cognados/MHC. (B) es el análisis que muestra la actividad de unión de las proteínas de fusión a IL15R α .

La Figura 18 es un gráfico que muestra las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión que apoyan el crecimiento de células que portan IL15R como se determina mediante un análisis de proliferación celular.

La Figura 19 (A - C) son gráficos que muestran la capacidad de las proteínas de fusión de TCR/IL-15 que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o aumentar el crecimiento de células que portan IL15R, como se determina mediante un análisis de proliferación celular. (A) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir la proliferación de células CTLL-2 que portan IL15R (complejo receptor $\alpha\beta\gamma$) de alta afinidad. (B) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para inhibir o potenciar la proliferación células 32D β que portan IL15R (complejo receptor $\beta\gamma$) de baja afinidad. (C) es un gráfico que muestra la actividad de las proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 para bloquear la proliferación estimulada por TCR/IL15wt de células CTLL-2 que portan IL15R de alta afinidad (complejo receptor $\alpha\beta\gamma$).

La Figura 20 representa los efectos de la incubación in vitro de células de NK con complejos de proteínas de fusión diméricas de TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15 sobre la supervivencia de xenoinjertos de ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores. A los ratones carentes de sistema inmunitario atímicos se les inyectaron células NSCLC A549-A2 humanas para permitir el establecimiento de metástasis de pulmón. Las células NK purificadas aisladas de bazo de ratones donantes alogénicos se incubaron in vitro con rhIL-2, MART1scTCR-IL2, c264scTCR-IL2 o c264scTCR-IL15/c264scTCR-IL15R α y se transfirieron adoptivamente a los ratones portadores de tumores que habían sido pretratados con ciclofosfamida (CTX), como se indica en la leyenda de la figura. Se trazó el porcentaje de supervivencia después del tratamiento.

La Figura 21 expone la Tabla 1 que muestra las sustituciones de aminoácidos en las variantes de IL-15 y los efectos de estos cambios sobre la actividad de IL-15.

Las Figuras 22A-B exponen la secuencia de aminoácidos de la IL-15 (SEC ID NO: 1) y la secuencia de ácido nucleico de IL-15 (SEC ID NO: 2), respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Se ha establecido que IL-15 se une de forma estable al dominio extracelular del IL-15R α y que el complejo resultante es capaz de modular (es decir, estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del complejo de IL-15R de afinidad intermedia o elevada (1-4). Además, se ha demostrado que el TCR de cadena sencilla o los polipéptidos de anticuerpos se pueden fusionar a las citoquinas y otros dominios efectores inmunitarios y que tales moléculas de fusión biespecíficas conservan la actividad funcional de ambos dominios de fusión (5-8). Adicionalmente, se ha demostrado que las formas multivalentes del TCR proporcionan una mayor unión a sus ligandos (9).

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para los términos específicos que se utilizan en la siguiente descripción escrita.

Según se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. El término "una molécula de ácido nucleico"

incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

Tal según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "que comprende" signifique que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros elementos. "Que consiste esencialmente en", cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación ni portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" significará que excluye más elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para la administración de las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y de cadena sencilla, así como anticuerpos biespecíficos.

El término "antígeno", según se utiliza en la presente memoria representa cualquier sustancia que hace que el sistema inmunitario produzca anticuerpos o respuestas inmunitarias mediadas por células específicas contra ella. Un antígeno asociado a una enfermedad es cualquier sustancia que está asociada con cualquier enfermedad.

Se pretende que el término "polipéptido biológicamente activo" según se utiliza en la presente memoria se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, o lipoproteína que puede producir los efectos deseados comentados en la presente memoria, incluyendo un TCR o un complejo de una proteína de fusión de anticuerpo con actividad de unión al antígeno.

Se pretende que el término "célula", según se utiliza en la presente memoria incluya cualquier célula primaria procariótica, eucariótica o línea celular inmortalizada, cualquier grupo de células tales como, un tejido o un órgano. Preferiblemente las células son de mamífero y particularmente de origen humano, y pueden estar infectadas por uno o más patógenos. Una "célula anfitriona" de acuerdo con la invención puede ser una célula transfectada, transformada, transducida o infectada de cualquier origen, incluyendo células procarióticas, eucariótica, de mamífero, de ave, de insecto, de planta o bacteriana, o puede ser una célula de cualquier origen que se puede utilizar para propagar un ácido nucleico descrito en la presente memoria.

Se pretende que el término "molécula conjugada", según se utiliza en la presente memoria se refiera un TCR o molécula de anticuerpo y una molécula efectora, normalmente un molécula química o sintetizada unida covalentemente (es decir fusionada) mediante un método químico u otro método adecuado. Si se desea, la molécula conjugada se puede fusionar en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora peptídica o una molécula portadora. Alternativamente, el conector peptídico o portador se pueden utilizar para ayudar a la construcción de la molécula conjugada. Las moléculas conjugadas específicamente preferidas son toxinas conjugadas o marcas detectables.

Se pretende que el término "molécula efectora" según se utiliza en la presente memoria se refiera a una secuencia de aminoácidos tal como una proteína, polipéptido o péptido; un azúcar o polisacárido; un lípido o un glicolípido, glicoproteína, lipoproteína o agente químico que puede producir los efectos deseados comentados en la presente memoria, incluyendo un dominio de IL-15, variante de IL-15 o receptor de IL-15 tal como IL-15R α , IL-2R β o γ C, o fragmentos funcionales de los mismos.

Los términos "molécula de fusión" y "proteína de fusión" se utilizan indistintamente y se pretende que se refieran a un polipéptido biológicamente activo, normalmente un TCR o anticuerpo y una molécula efectora normalmente una secuencia de proteína o péptido unida covalentemente (es decir fusionada) por medio de un método recombinante, químico u otro método adecuado. Si se desea, la molécula de fusión se puede fusionar en uno o varios sitios a través de una secuencia conectora peptídica. Alternativamente, el conector peptídico se puede utilizar para ayudar a la construcción de la molécula de fusión. Las moléculas de fusión específicamente preferidas son las proteínas de fusión. Generalmente molécula de fusión también puede estar compuesta de moléculas conjugadas.

Se pretende que el término "célula anfitriona" se refiera a cualquier célula procariótica o eucariótica que contenga un vector de clonación o un vector de expresión. Este término también incluye aquellas células procarióticas o eucarióticas que se han modificado genéticamente para contener el gen o los genes clonados en el cromosoma o el genoma de la célula anfitriona.

Se pretende que el término "respuesta inmunitaria", según se utiliza en la presente memoria se refiera al proceso mediante el cual las células inmunitarias son estimuladas y reclutadas de la sangre a tejidos linfoides así como no linfoides a través de un proceso multifactorial que implica distintas etapas de adherencia y activación. Las condiciones de activación causan la liberación de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y otros factores, regulan al alza la expresión de las moléculas de adherencia y otras moléculas de activación sobre las células inmunitarias, promueven la adherencia, cambios morfológicos, y/o la extravasación concurrente con quimiotaxis a través de los tejidos, aumentan la proliferación celular y la actividad citotóxica, estimulan la presentación de

antígenos y proporcionan otros cambios fenotípicos incluyendo la generación de tipos de células de memoria. También se pretende que la respuesta inmunitaria se refiera a la actividad de las células inmunitarias para suprimir o regular la actividad inflamatoria o citotóxica de otras células inmunitarias.

5 Según se utilizan en la presente memoria, los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan indistintamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas helicoidales de hebra sencilla, doble y triple, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, moléculas antisentido, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, aptámeros, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de 10 cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas (p. ej., que comprenden bases modificadas, azúcares, y/o conectores internucleotídicos).

15 Se pretende que el término "polipéptido" se refiera a cualquier polímero que consista preferiblemente esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, independientemente de su tamaño. Aunque el término "proteína" se utiliza a menudo en referencia a proteínas relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la materia a menudo se solapa. El término "polipéptido" se refiere generalmente a proteínas, polipéptidos, y péptidos a no ser que se indique lo contrario. Los péptidos útiles de acuerdo con la presente invención, en general, tendrán generalmente entre aproximadamente 0,1 y 100 KD o más 20 hasta aproximadamente 1.000 KD, preferiblemente entre aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 50 KD a juzgar por las técnicas convencionales de dimensionamiento de moléculas tales como centrifugación o electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

25 Se pretende que los términos "prevenir", "que previene", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieran a la reducción de la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto, que no tiene, pero está en riesgo de o es susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

30 Se pretende que el término "anticuerpo de cadena sencilla" haga referencia a un anticuerpo basado en un formato de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden consistir en subunidades de anticuerpos de unión mínimas. Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar solamente con aquellas regiones de unión al antígeno de los anticuerpos en una cadena polipeptídica sencilla plegada establemente. Como tales, los anticuerpos de cadena sencilla tienen un tamaño considerablemente menor que las inmunoglobulinas clásicas pero conservan las propiedades de unión específicas del antígeno de los anticuerpos. Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden conectar con una amplia gama de ligandos, por ejemplo moléculas efectoras o productos conjugados de fármacos.

35 El término "soluble" según se utiliza en la presente memoria significa que la molécula de fusión y concretamente una proteína de fusión no sedimenta fácilmente a una centrifugación de fuerza G baja (p. ej. menos de aproximadamente 30.000 revoluciones por minuto en una centrífuga convencional) en un tampón acuoso, p. ej., medio celular. Adicionalmente, la molécula de fusión es soluble si permanece en disolución acuosa a una temperatura mayor de aproximadamente 5-37°C y a un pH neutro o próximo al neutro en presencia de una concentración baja o nula de un detergente aniónico o no iónico. En estas condiciones, una proteína soluble tendrá a menudo un valor de sedimentación bajo p. ej., menos de aproximadamente 10 a 50 unidades svedberg.

40 Las disoluciones acuosas referidas en la presente memoria tienen típicamente un compuesto tamponador para establecer un pH, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5-9, y un intervalo de fuerza iónica entre aproximadamente 2 mM y 500 mM. En ocasiones se añade un detergente no iónico suave inhibidor de la proteasa. Adicionalmente, se puede añadir si se desea una proteína portadora tal como albúmina de suero bovino (BSA) a unos pocos mg/ml. Los tampones acuosos ilustrativos incluyen solución salina tamponada con fosfato, 45 solución salina tamponada con tris, u otros tampones y formulaciones de medios celulares conocidos.

Se pretende que el término "estimular" o "que estimula" haga referencia a incrementar, amplificar, aumentar, reforzar una respuesta inmunitaria. La estimulación puede ser una alteración positiva. Un incremento ilustrativo puede ser p. ej., de 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o incluso 90-100%. Otros incrementos ilustrativos incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces, o incluso 100.

50 Se pretende que el término "suprimir" o "que suprime" haga referencia a reducir, atenuar, disminuir, detener, o estabilizar una respuesta inmunitaria. La supresión puede ser una alteración negativa. Una reducción ilustrativa puede ser p. ej., de 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o incluso 90-100%. Las reducciones ilustrativas incluyen 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 40 veces, o incluso 100 veces.

55 Se pretende que el término "Receptor de células T" (TCR) haga referencia a polipéptidos de un complejo de proteínas integrantes de la membrana que participa en la activación de las células T en respuesta a la presentación del antígeno. Las células T reconocen un péptido unido al producto del MHC a través del receptor de células T (TCR) heterodimérico $\alpha\beta$. El repertorio de TCR tiene una considerable diversidad creada por el mismo mecanismo de reordenamiento génico utilizado en los genes de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos [Tonegawa, S.

(1988) Biosci. Rep. 8:3-26]. La mayor parte de la diversidad se genera en las conexiones de las regiones variable (V) y de empalme (J) (o diversidad, D) que codifican la región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de las cadenas α y β [Davis and Bjorkman (1988) Nature 334:395-402]. Sin embargo, los TCR no experimentan mutaciones puntuales somáticas como lo hacen los anticuerpos y, quizás no casualmente. Los TCR tampoco experimentan el mismo grado de maduración de la afinidad que los anticuerpos. Los TCR como ocurre en la naturaleza parece que tienen afinidades que oscilan de 10^5 a 10^7 M^{-1} mientras que los anticuerpos tiene típicamente afinidades que oscilan de 10^5 a 10^9 M^{-1} [Davis et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16:523-544; Eisen et al. (1996) Adv. Protein Chem. 49:1-56]. Si bien la ausencia de mutación somática en los TCR puede estar asociada con afinidades inferiores, también se ha señalado que no es una ventaja selectiva para un TCR tener una afinidad más alta. De hecho, los modelos de activación en serie [Valitutti et al. (1995) Nature 375:148-151] y de actividad correctora cinética [Rabinowitz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1401-1405] de activación de células T sugieren ambos que tasas de disociación más extensas (asociadas con una afinidad más alta) serían perjudiciales para el proceso de señalización. También es posible que los TCR de afinidad más alta no mantuvieran la especificidad por el péptido requerida para las respuestas de la célula T. Por ejemplo, los péptidos unidos en la hendidura del MHC despliegan una superficie accesible limitada [Bjorkman, P. J. (1997) Cell 89:167-170], lo que a su vez puede limitar la cantidad de energía que se puede generar en la interacción. Por otro lado, el aumento de la afinidad de un TCR dirigiendo la energía hacia las hélices del MHC conduciría presumiblemente a la delección tímica durante la selección negativa [Bevan, M. J. (1997) Immunity 7:175-178]. Se pretende que el término "TCR" abarque receptores de células T policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, heterodiméricos y de cadena sencilla o un fragmento funcional de los mismos, incluyendo la molécula que comprende los dominios $V\alpha$ y $V\beta$ del TCR. Se pretende que el término "TCR" también abarque los receptores de células T descritos por ejemplo en, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Titulada "T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF", presentada el 19 de Marzo de 2008 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2003 01-44474A1.

El término "vector" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de replicarse autónomamente en una célula anfitriona y puede aceptar ADN foráneo. Un vector porta su propio origen de replicación, uno o más sitios de reconocimiento únicos para endonucleasas de restricción que se pueden utilizar para la inserción de ADN foráneo, y usualmente marcadores seleccionables tales como genes que codifican resistencia a antibióticos, y a menudo secuencias de reconocimiento (p. ej. promotor) para la expresión del ADN insertado. Los vectores comunes incluyen vectores plasmídicos y vectores de fagos.

Receptores de células T (TCR)

Las células T son un subgrupo de células que junto con otros tipos de células inmunitarias (polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B, NK), constituyen el componente celular del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas las células T funcionan en la vigilancia inmunológica y en la eliminación de antígenos foráneos. Sin embargo, en condiciones patológicas existen pruebas convincentes de que las células T desempeñan un papel importante en la causa y la propagación de la enfermedad. En estos trastornos, el fallo de la tolerancia inmunológica de las células T, ya sea central o periférica es un proceso fundamental en la causa de las enfermedades autoinmunitarias.

El TCR está compuesto de al menos siete proteínas transmembrana. El heterodímero unido mediante disulfuro (alfa..beta.) forma la unidad de reconocimiento del antígeno monotípico, mientras que las cadenas invariables de CD3, que consisten en ϵ ., γ ., δ ., y ζ ., y η ., son responsables del acoplamiento del ligando que se une en las rutas de señalización que dan como resultado la activación de las células T y de la elaboración de las respuestas inmunitarias celulares. A pesar de la diversidad génica de las cadenas de TCR, dos características estructurales son comunes a todas las subunidades conocidas. En primer lugar, son proteínas transmembrana con un solo dominio que atraviesa la membrana, presumiblemente en hélice alfa. En segundo lugar, todas las cadenas de los TCR tienen la característica inusual de poseer un aminoácido cargado dentro del dominio transmembrana pronosticado. Las cadenas invariantes tiene una sola carga negativa, conservada entre ratones y seres humanos, y las cadenas variantes poseen una (TCR-beta) o dos (TCR-alfa) cargas positivas. La secuencia transmembrana del TCR-alfa. está altamente conservada en varias especies y de este modo filogenéticamente pueden cumplir un papel funcional importante. La secuencia octapeptídica que contiene los aminoácido hidrófilos lisina y arginina es idéntica entre las especies.

Una respuesta de las células T es modulada por la unión del antígeno al TCR. Un tipo de TCR es un heterodímero unido a membrana que consiste en una cadena α y β que se asemeja a una región variable (V) y constante (C) de inmunoglobulina. La cadena α de TCR incluye una cadena $V\alpha$ y $C\alpha$ conectadas covalentemente, mientras que la cadena β incluye una cadena $V\beta$ conectada covalentemente a una cadena $C\beta$. Las cadenas $V\alpha$ y $V\beta$ forman un bolsillo o hendidura al que se pueden unir un superantígeno o un antígeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (conocido en seres humanos como complejo HLA). Véase generalmente Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3^a Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993).

La invención proporciona un dominio de interleuquina-15 (IL-15) que es una variante de IL-15 (también referida como IL-15 mutante). La variante de IL-15 comprende una secuencia de aminoácidos diferente que la proteína IL-15 nativa (o de tipo salvaje). La variante de IL-15 se une preferiblemente al polipéptido IL-15Ra y funciona como un agonista

de IL-15. Preferiblemente las variantes de IL-15 con actividad agonística tienen una actividad superagonística. En algunas realizaciones, la variante de IL-15 puede funcionar como un agonista de IL-15 independiente de su asociación con IL-15Ra. Los agonistas de IL-15 son ilustrados por una actividad biológica comparable o aumentada con IL-15 de tipo salvaje.

5 En algunos ejemplos, la variante de IL-15 se une con una mayor actividad de los receptores IL-15RβγC. En algunas realizaciones, la secuencia de la variante de IL-15 tiene al menos un cambio de aminoácido, p. ej., sustitución o
 10 deleción, en comparación con la secuencia de IL-2 nativa, dando como resultado tales cambios una actividad agonística o antagónica de IL-15. Preferiblemente las sustituciones/deleciones de aminoácidos están en los dominios de IL-15 que interactúan con IL-15Rβ y/o γC. Más preferiblemente, las sustituciones/deleciones de aminoácidos no afectan a la unión al polipéptido de IL-15Ra o la capacidad de producir la variante de IL-15. Las sustituciones/deleciones de aminoácidos apropiadas para generar variantes de IL-15 se pueden identificar sobre la base de estructuras de IL-15 supuestas o conocidas, comparaciones de IL-15 con moléculas homólogas tales como IL-2 con una estructura conocida, a través de mutagénesis racional o al azar y análisis funcionales, según se proporciona en la presente memoria, u otros métodos empíricos. Adicionalmente las sustituciones de aminoácidos adecuadas pueden ser cambios e inserciones conservativos o no conservativos de aminoácidos adicionales. Se describen variantes de IL-15 que contienen una o más sustituciones/deleciones un ácido amino en la posición 8, 61, 65, 72, 92, 101, 108, o 111 de la secuencia de IL-15 humana madura; concretamente, sustituciones D8N ("D8" se refiere a la posición del residuo de aminoácido en la secuencia de la IL-15 humana madura nativa y "N" se refiere al residuo de aminoácido sustituido en esa posición en la variante de IL-15), D8A, D61A, N65A, N72R o Q108A dan como resultado variantes de IL-15 con actividad antagónica y las sustituciones N72D dan como resultado variantes de IL-15 con actividad agonística.

La variante de IL-15 de la invención es una proteína no de fusión. Preferiblemente, la forma no de fusión de la variante de IL-15 es una citoquina soluble que funciona como un agonista de IL-15.

25 En algunas realizaciones, la variante de IL-15 no de fusión forma un complejo con IL-15Ra mientras que en otra realización, actúa de forma independiente de IL-15Ra.

Los polipéptidos de IL-15 e IL-15RA de la invención corresponden adecuadamente en secuencia de aminoácidos a moléculas de IL-15 e IL-15RA de origen natural, p. ej., moléculas de IL-15 e IL-15RA de ser humano, ratón u otro roedor, u otro mamífero.

30 Por ejemplo, la proteína se puede modificar mediante la inclusión de secuencias que codifican las secuencias de etiquetas que se pueden modificar, tales como la etiqueta de biotilación BirA o residuos de aminoácidos con cadenas laterales químicamente reactivas tales como Cys o His. Tales etiquetas de aminoácidos o aminoácidos químicamente reactivos se puede situar en una variedad de posiciones en la proteína de fusión, preferiblemente distales con respecto al sitio activo del polipéptido biológicamente activo o molécula efectora. Por ejemplo, el extremo C de una proteína de fusión soluble se puede unir covalentemente a una etiqueta u otra proteína fusionada que incluye tales uno o más aminoácidos reactivos. Se pueden incluir cadenas laterales adecuadas para conectar químicamente dos o más proteínas de fusión a un dendrímero adecuado u otra nanopartícula para dar una molécula multivalente. Los dendrímeros son polímeros químicos sintéticos que pueden tener cualquiera de una serie de diferentes grupos funcionales en su superficie (D. Tomalia, *Aldrichimica Acta*, 26:91:101 (1993)). Los dendrímeros ilustrativos para uso de acuerdo con la presente invención incluyen p. ej., dendrímero de poliamina "starburst" E9 y dendrímero de poliamina "combust" E9, que pueden conectar residuos de cistina.

Ácidos nucleicos y Vectores

Ácidos nucleicos

La invención proporciona adicionalmente secuencias de ácido nucleico y en particular secuencias de ADN que codifican las presentes proteínas de fusión. Preferiblemente, la secuencia de ADN es transportada por un vector adecuado para la replicación extracromosómica tal como un fago, virus, plásmido, fagémido, cósmido, YAC, o episoma. En particular, se puede utilizar un vector de ADN que codifica una proteína de fusión deseada para facilitar los métodos preparativos descritos en la presente memoria y obtener cantidades significativas de la proteína de fusión. La secuencia de ADN se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de la proteína insertada. Se puede utilizar una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar la secuencia codificante de la proteína. Estos incluyen sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, 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 ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmidico. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede emplear cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Véanse generalmente Sambrook et al., *Supra* y Ausubel et al. más arriba.

La homología entre secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante análisis de hibridación de ADN, en donde la estabilidad del híbrido de ADN de doble hebra depende del grado de emparejamiento de bases que se

5 produzca. Las condiciones de alta temperatura y/o de bajo contenido de sal reducen la estabilidad del híbrido, y se pueden variar para evitar la hibridación de las secuencias que tienen menos de un grado seleccionado de homología. Por ejemplo, para las secuencias con aproximadamente 55% de contenido de GC, las condiciones de hibridación y lavado de 40-50°C, 6XSSC (tampón de cloruro de sodio/citrato de sodio) y SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1% indican aproximadamente una homología de aproximadamente 60-70%, las condiciones de hibridación y lavado de 50-65°C, 1XSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 82-97%, y las condiciones de hibridación y lavado de 52°C, 0,1XSSC y SDS al 0,1% indican una homología de aproximadamente 99-100%. También se encuentra disponible una amplia gama de programas informáticos para comparar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos (y medir el grado de homología), y una lista que proporciona fuentes de soporte lógico tanto asequible comercialmente como libre se encuentra en Ausubel et al. (1999). Los algoritmos de comparación de secuencias y alineamiento de secuencias múltiples fácilmente asequibles son, respectivamente, los programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) y ClustalW. BLAST está disponible en la red en ncbi.nlm.nih.gov y una versión de ClustalW está disponible en 2.ebi.ac.uk.

Vectores y Expresión

15 La selección de vectores adecuados puede realizarse empíricamente basándose en factores relacionados con el protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debe ser compatible con, y tener el replicón apropiado para el anfitrión que se está empleando.

20 Las células anfitrionas adecuadas incluyen células eucarióticas y procarióticas, preferiblemente aquellas células que pueden transformarse fácilmente y exhiben un rápido crecimiento en medio de cultivo. Las células anfitrionas específicamente preferidas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc. y eucariotas tales como células animales y cepas de levadura, p. ej., *S. cerevisiae*. Generalmente se prefieren células de mamíferos, particularmente J558, NSO, SP2-O o CHO. Otros anfitriones adecuados incluyen, p. ej., células de insecto tales como Sf9. Se emplean condiciones de cultivo convencionales. Véase Sambrook, más arriba. A continuación se pueden seleccionar las líneas celulares transformadas o transfectadas estables.

25 Por lo tanto las células anfitrionas incluyen específicamente, células y órganos de levadura, mosca, gusano, planta, rana, mamífero que son capaces de propagar el ácido nucleico que codifica la fusión. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen células CHO dhfr- (Urlaub y Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), células 293 (Graham et al., J Gen. Virol., 36:59 (1977)) o células de mieloma de tipo SP2 o NSO (Galfre y Milstein, Meth. Enzymol, 73 (B): 3 (1981)).

30 Las células anfitrionas capaces de propagar el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada abarcan células eucariotas no de mamífero, así, como de insecto (p. ej., *Sp. frugiperda*), levadura (p. ej., *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*; como fue revisado en general por Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5): 486-496 (1992)), células fúngicas y vegetales. También se contemplan ciertos procariotas tales como *E. coli* y *Bacillus*.

35 El ácido nucleico que codifica una proteína de fusión deseada se puede introducir en una célula anfitriona mediante técnicas convencionales para la transfección de células. Se pretende que el término "transfectar" o "transfección" incluya todas las técnicas convencionales para introducir ácido nucleico en células anfitrionas, incluyendo co-precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección, transducción y/o integración viral. Los métodos adecuados para transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook et al. más arriba, y en otros libros de texto de laboratorio.

40 Se pueden utilizar diversos promotores (región reguladora del inicio de la transcripción).

La selección del promotor apropiado depende del anfitrión de expresión propuesto. Los promotores procedentes de fuentes heterólogas se pueden utilizar siempre y cuando sean funcionales en el anfitrión seleccionado.

45 **0074]** La selección del promotor también depende de la eficacia y del nivel de producción del péptido o proteína deseados. A menudo se emplean promotores inducibles tales como TAC con el fin de aumentar drásticamente el nivel de expresión de proteína en *E. coli*. La expresión en exceso de las proteínas puede ser perjudicial para las células anfitrionas. En consecuencia, el crecimiento de la célula anfitriona puede ser limitado. El uso de sistemas promotores inducibles permite que las células anfitrionas sean cultivadas a densidades aceptables antes de la inducción de la expresión génica, facilitando de este modo mayores rendimientos de productos. También se puede utilizar el procesamiento en el anfitrión de expresión. Por ejemplo, los pares de secuencia señal/célula anfitriona adecuados incluyen la secuencia señal *sacB* de *B. subtilis* para la secreción en *B. subtilis*, y la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae* o Phol de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* para la secreción en *P. pastoris*.

55 Los elementos para potenciar la transcripción y la traducción han sido identificados para los sistemas de expresión de proteínas eucarióticas. Por ejemplo, el posicionamiento del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de 1000 pb en cada lado de un promotor heterólogo puede elevar los niveles de transcripción de 10 a 400 veces en células vegetales. El constructo de expresión también debe incluir las secuencias de inicio de la traducción apropiadas. La modificación del constructo de expresión para incluir una secuencia consenso de Kozak para un

inicio adecuado de la traducción puede aumentar el nivel de traducción 10 veces.

A menudo se emplea un marcador selectivo, que puede ser parte del constructo de expresión o puede estar separado de él (p. ej., transportado por el vector de expresión), de manera que el marcador se pueda integrar en un sitio diferente del gen de interés. Los ejemplos incluyen marcadores que confieren resistencia a los antibióticos (p. ej., bla confiere resistencia a la ampicilina para las células anfitrionas de *E. coli*, nptII confiere resistencia a la kanamicina a una amplia variedad de células procariotas y eucariotas) o que permiten que el anfitrión crezca en un medio mínimo (p. ej., HIS4 permite que *P. pastoris* o *S. cerevisiae* His⁻ crezcan en ausencia de histidina). El marcador seleccionable tiene sus propias regiones reguladoras del inicio y terminación de la transcripción y de la traducción para permitir la expresión independiente del marcador. Si se emplea la resistencia a antibióticos como marcador, la concentración del antibiótico para la selección variará dependiendo del antibiótico, oscilando generalmente entre 10 y 600 µg de antibiótico/ml de medio.

El constructo de expresión se ensambla mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante conocidas (Sambrook et al, 1989; Ausubel et al, 1999). La digestión y ligación con enzimas de restricción son etapas básicas empleadas para unir dos fragmentos de ADN. Los extremos del fragmento de ADN pueden requerir modificación antes de la ligación, y esto se puede conseguir rellenando los salientes, suprimiendo las porciones terminales de los fragmentos con nucleasas (p. ej., ExoIII), mutagénesis dirigida al sitio, o mediante la adición de nuevos pares de bases por medio de PCR. Se pueden emplear poliligadores y adaptadores para facilitar la unión de los fragmentos seleccionados. El constructo de expresión se ensambla típicamente en fases que emplean rondas de restricción, ligación, y transformación de *E. coli*. Se conocen en la técnica numerosos vectores de clonación adecuados para la construcción del constructo de expresión (Lambda.ZAP y pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, California, PET, Novagen Inc., Madison, Wis - citado en Ausubel et al, 1999) y la elección concreta no es crítica para la invención. La selección del vector de clonación se verá influida por el sistema de transferencia génica seleccionado para la introducción del constructo de expresión en la célula anfitriona. Al final de cada fase, el constructo resultante se puede analizar mediante análisis de restricción, de la secuencia de ADN, de hibridación y de PCR.

El constructo de expresión se puede transformar en el anfitrión en forma del constructo del vector de clonación, ya sea lineal o circular, o se puede retirar del vector de clonación y utilizar tal cual o introducirlo en un vector de liberación. El vector de liberación facilita la introducción y el mantenimiento del constructo de expresión en el tipo de célula anfitriona seleccionada. El constructo de expresión se introduce en las células anfitrionas mediante cualquiera de una serie de sistemas de transferencia de genes conocidos (p. ej., competencia natural, transformación mediada químicamente, transformación de protoplastos, electroporación, transformación biolística, transfección, o conjugación) (Ausubel et al, 1999; Sambrook et al., 1989). El sistema de transferencia génica seleccionado depende de las células anfitrionas y de los sistemas vectores utilizados.

Por ejemplo, el constructo de expresión se puede introducir en células de *S. cerevisiae* mediante transformación de protoplastos o electroporación. La electroporación de *S. cerevisiae* se lleva a cabo fácilmente, y proporciona eficacias de transformación comparables a la transformación de esferoplastos.

Métodos

Terapéutico

Los ejemplos de las enfermedades que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, neoplasias, incluyendo cáncer, o infecciones virales. Mediante "neoplasia" se quiere significar cualquier enfermedad que es causada por o resulta de niveles inadecuadamente altos de división celular, niveles inadecuadamente bajos de apoptosis, o ambos. Por ejemplo, el cáncer es un ejemplo de una neoplasia. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, leucemias (p. ej., leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogloma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Se considera que los trastornos linfoproliferativos también son enfermedades proliferativas.

También se incluyen métodos de estimulación de la respuesta inmunitaria en un mamífero que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de la variante de IL-15 como se describe en la presente memoria.

También se describen métodos de supresión de respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de la variante de IL-15 como se describe en la presente memoria. En el caso de la supresión inmunitaria, puede ser particularmente ventajosa una variante de IL-15 que comprende antagonistas de IL-15 o dominios IL-15 que carecen de la capacidad para unirse al complejo IL-15 $\beta\gamma_c$.

- 5 También se pueden utilizar diferentes terapias combinadas, así como con otros agentes terapéuticos conocidos, tales como fármacos anti-inflamatorios para proporcionar un tratamiento más eficaz de un trastorno. Por ejemplo, se puede utilizar variantes de IL-15 inmunosupresoras combinadas con agentes anti-inflamatorios tales como corticosteroides y fármacos no esteroideos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y alergias.

- 10 Los compuestos de la invención serán especialmente útiles para un paciente humano que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad, trastorno o afección malignos. Los compuestos de la invención serán particularmente útiles en la elección como diana de determinados antígenos tumorales en pacientes humanos. Los ejemplos específicos de las enfermedades que se pueden tratar incluyen cánceres, p. ej., de mama, de próstata, etc., infecciones virales, p. ej., VHC, VIH, etc., así como otros trastornos específicos de las afecciones mencionadas en la presente memoria.

Dosificación y administración

- 15 La administración de los compuestos de la invención se puede realizar mediante una variedad de rutas adecuadas, incluyendo oral, tópica (incluyendo transdérmica, bucal o sublingual), nasal y parenteral (incluyendo inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular) siendo particularmente preferidas la ruta oral o parenteral. También se apreciará que el método preferido de administración y la cantidad de dosificación pueden variar con, p. ej., la afección y la edad del receptor.

- 20 Los compuestos de la invención se pueden usar en terapia solos o junto con otros medicamentos tales aquellos con actividad farmacológica reconocida para tratar las indicaciones deseadas. Los medicamentos ilustrativos incluyen terapias reconocidas tales como cirugía, radiación, quimioterapia y otras formas de inmunoterapia (p. ej., vacunas, terapias basadas en anticuerpos). Los compuestos de esta invención se pueden administrar antes, durante o después de tales terapias según se requiera.

- 25 Si bien uno o más compuestos de la invención se pueden administrar solos, también pueden estar presentes como parte de una composición farmacéutica mezclados con un excipiente convencional, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración parenteral, oral u otra administración deseada y que no reaccionen perjudicialmente con los compuestos activos y no sean perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones farmacéuticas de la invención en general comprenden una o más variante de IL-15 de la invención o constructos de ADN que codifican tales compuestos
30 junto con uno o más portadores aceptables. Los portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroethral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con
35 agentes coadyuvantes, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos.

- 40 Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas las disoluciones, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas así como suspensiones, emulsiones, o implantes, incluyendo supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes.

- Para la aplicación entérica, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas o cápsulas que tienen un aglutinante portador de talco y/o carbohidrato o similar, siendo preferiblemente el portador lactosa y/o almidón de
45 maíz y/o almidón de patata. Se puede utilizar un jarabe, elixir o similar en donde se emplea un vehículo edulcorado. Las composiciones de liberación sostenida se pueden formular incluyendo aquellas en las que el componente activo está protegido con recubrimientos diferencialmente degradables, p. ej., mediante microencapsulación, recubrimientos múltiples, etc.

- Los compuestos terapéuticos de la invención también se pueden incorporarse a liposomas. La incorporación se
50 puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos de preparación de liposomas conocidos, por ejemplo sonicación y extrusión. Los métodos convencionales adecuados de preparación de liposomas también son descritos p. ej., por A.D. Bangham et al., *J. Mol. Biol.*, 23:238-252 (1965); F. Olson et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9-23 (1979); F. Szoka et al, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75:4194-4198 (1978); S. Kim et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339-348 (1983); y Mayer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168 (1986).

- 55 Adicionalmente se describen métodos para invocar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ser humano, incluyendo la vacunación de un mamífero tal como un ser humano contra un agente infeccioso o un trastorno diana, tal como el cáncer.

Estos métodos comprenden administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una secuencia de ADN que comprende un vector de ADN que codifica una variante de IL-15 de la invención. La preparación de los vectores de expresión de las variantes de IL-15 se describe más arriba y en los Ejemplos que siguen. Se ha informado sobre los métodos para la administración del ADN plasmídico, la absorción de ese ADN por las células del sujeto al que se ha administrado y la expresión de la proteína. Véase Ulmer, J.B., et al, Science (1993) 259:1745-1749.

Los vectores de ADN que codifican las variantes de IL-15 de la invención se administran adecuadamente a un mamífero incluyendo un ser humano, preferiblemente mediante inyección intramuscular. La administración de ADNc al músculo esquelético de un mamífero con la absorción subsiguiente del vector de expresión administrado por parte de las células musculares y la expresión de la proteína codificada por el ADN han sido descritas por Ulmer et al. y representan un protocolo ilustrativo [Ulmer, J.B., et al, Science 259:1745-1749]. La dosis óptima para una aplicación terapéutica dada se puede determinar mediante métodos convencionales.

Además del tratamiento de trastornos humanos, las variantes de IL-15 y los constructos de ADN que codifican tales moléculas tendrán un uso significativo para aplicaciones veterinarias, p. ej., tratamiento de trastornos del ganado tal como ganado vacuno, ovejas, etc. y animales domésticos tales como perros y gatos.

Se apreciará que las cantidades preferidas reales de una variante de IL-15 dada o constructo de ADN que codifica la misma utilizadas en una terapia dada variarán de acuerdo con el compuesto o compuestos activo concretos que se estén utilizando, las composiciones concretas formuladas, el modo de aplicación, el sitio concreto de administración, el peso del paciente, la salud general, el sexo, etc., la indicación concreta que esté siendo tratada, etc. y otros factores semejantes que son reconocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el médico o veterinario a cargo. La tasas de administración óptimas para un protocolo de administración dado pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica usando ensayos de determinación de dosificación convencionales realizados por ejemplo, con respecto a las directrices anteriores y los ensayos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Diseño de un complejo de proteína de fusión que comprende las proteínas de fusión de scTCR/huIL15 y scTCR/huIL15R α . (de referencia)

Se ha establecido que la IL-15 se une de forma estable al dominio extracelular de IL-15R α y que el complejo resultante es capaz de modular (es decir, estimular o bloquear) las respuestas inmunitarias a través del Complejo de IL-15R de afinidad intermedia o elevada (1-4). Además, se ha demostrado que el TCR de cadena sencilla o los polipéptidos de anticuerpos se pueden fusionar a citoquinas y otros dominios efectores inmunitarios y que tales moléculas de fusión biespecífica conservan la actividad funcional de ambos dominios de fusión (5-8). Adicionalmente, se ha demostrado que las formas multivalentes del TCR proporcionan una mayor unión a sus ligandos (9). Por lo tanto una característica de la invención proporciona un complejo de la proteína de fusión que comprende al menos una proteína de fusión en donde un primer polipéptido de TCR se fusiona a IL-15 y al menos una fusión en donde un segundo polipéptido de TCR se fusiona al dominio extracelular de IL-15R α , de manera que las dos proteínas de fusión forman un complejo a través de las interacciones de unión entre los dominios de IL-15 e IL-15R α . En tal complejo de proteína de fusión, los polipéptidos de TCR pueden ser iguales o diferentes y pueden estar en formato de cadena sencilla o heterodimérico.

Un ejemplo de un complejo de la proteína de fusión que contiene polipéptidos de TCR de cadena sencilla se muestra esquemáticamente en la **Figura 1A**. En este complejo de proteína de fusión, los dominios de TCR multivalentes proporcionan una mayor avidéz/afinidad de unión por sus ligandos. Los ligandos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, complejos de péptido/MHC. Los dominios de IL-15/IL-15R α proporcionan actividad inmunomoduladora. Los constructos de proteínas de fusión representativos que comprenden el complejo de la proteína de fusión se muestran esquemáticamente en la **Figura 1B**. En estos constructos el polipéptido de TCR es un TCR de cadena sencilla (264scTCR) compuesto de los dominios TCR-V α y TCR-V β -C β conectados por una secuencia conectora peptídica ((G₄S)₄). El polipéptido scTCR se fusiona a cualquiera de los dominios de IL-15 o IL-15R α , directamente o a través de una secuencia conectora peptídica. Partiendo del polipéptido scTCR hay una secuencia de péptido señal (o péptido líder) que permite la expresión soluble. El péptido señal se escinde posteriormente durante el transporte de la proteína para generar la proteína de fusión madura. En otros ejemplos del complejo de la proteína de fusión, un dominio de anticuerpo puede sustituir a un dominio de TCR representado en la **Figuras 1^a y 1B**. Tal anticuerpo puede estar en un formato de cadena sencilla o heteromultimérico. Para cualquiera de los complejos de proteínas de fusión descritos anteriormente, las secuencias pueden ser humanas o no humanas, p. ej., pero no limitadas a ratón. Estas secuencias se pueden emplear para una parte o la totalidad de los dominios de la proteína de fusión. Además, la disposición de los dominios puede variar siempre que las proteínas de fusión sigan siendo solubles y funcionales.

Ejemplo 2 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/huIL15 en un vector de expresión. (de referencia)

El aislamiento y la caracterización de los genes de TCR para TCR específico de p53 (aa264-272) se describieron previamente (5-7). Para obtener genes de IL15 e IL15R α humanos, se aislaron PBMC humanas de 200 ml de sangre de un donante (Núm. de Lote 2238789, Community Blood Bank, Miami, FL) con HISTOPAGUE-1077 (Sigma). Las células (1,5 x 10⁷) se activaron por medio de 30 ng/ml de PMA (Sigma), 200 ng/ml de ionomicina, y 220 ng/ml de IL2

humana recombinante en IMDM que contenía FBS al 10% en una incubadora con CO₂ durante 10 días. Las células activadas (1 x 10⁷ por ml) se congelaron a -70°C para aplicaciones adicionales. Para purificar el ARN total de las PBMC activadas, se utilizó RNEASY PLUS MINI (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El Gen de IL15 humana que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total con el cebador directo

5' -CACCTTGCCATAGCCAGCTCTTC-3'

y el cebador inverso

5'-GTCTAAGCAGCAGAGTGATGTTTG-3'

por medio de SUPERScript III One-Step RT-PCR Platinum *Tag* HiFi (Invitrogen) de acuerdo con las siguientes condiciones: para RT; 55°C 30 min; 94°C, 2 min; para amplificar ADNc; 94°C, 30 segundos; 53°C, 30 segundos; 68°C, 1 min; x40 ciclos; 68°C, 5 min. El producto de ADNc de la PCR de IL15 humana de 600 pb se separó mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de la proteína IL15 humana madura se amplificó a partir del ADNc de IL15 humana de 600 pb con el cebador directo

5'-TGGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGTTGATGAACATTTGGAC-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 63°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El gen de la proteína IL15 humana madura se purificó en gel y se clonó en el vector lanzadera, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Vector (Invitrogen), con la reacción TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon que contenía el inserto de gen de la proteína IL15 humana madura se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGGTTAACAACTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'

y el cebador inverso

5'-ACGCGTTTATCAAGAAGTGTTGATGAACATTTGGAC-3'

mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 63°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El gen de la proteína IL15 humana madura se retiró del vector lanzadera mediante digestión con HpaI y MluI y se ligó en un vector de expresión pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR contiene el fragmento génico que codifica una secuencia líder de la cadena ligera de inmunoglobulina (o señal secretora) conectada a la proteína TCR de cadena sencilla química soluble específica del péptido p53 (aa264-272) (c264scTCR) (5). El vector también contiene regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción, incluyendo una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y regiones reguladoras 3' con supuestos elementos reguladores del anclaje a la matriz. El vector también contiene secuencias de ADN que permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor/gen neoR/poli-A de SV40) y bacterias (gen Ori/AMP). La clonación de fragmento de ADN que codifica la proteína de IL15 humana madura en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/huIL15 que comprendía la siguiente secuencia: 3'- líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/huIL15), que se muestra en la Figura 2A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR/huIL15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 2B** y la **Figura 2C**, respectivamente.

Ejemplo 3 - Construcción de la fusión génica de c264scTCR/huIL15 que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión (de referencia)

La construcción del vector pNEF38-c264scTCR/huIL15 se describió en el Ejemplo 2. Se utilizó una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en donde se sustituyeron tres residuos de cisteína por tres residuos de serina para conectar c264scTCR y huIL15. La región de bisagra se mutó y se amplificó a partir del gen 264scTCR/IgG1 descrito previamente (7) con el cebador directo

5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

ES 2 470 772 T3

5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

5 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de la bisagra de IgG humana mutada de 70 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de la región bisagra mutado se digirió con HpaI y MluI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. El clon que contenía el inserto del gen de la región bisagra mutado se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

10 5'-ATTATTACGCGTTGGAGACGGTGGAGATG-3'

mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La hULL15 se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/hULL15 descrito en el Ejemplo 2 con el cebador directo

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

15 y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

20 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de hULL15 de 380 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen hULL15 se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que contenía el gen mutado de la bisagra que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el inserto del gen de hULL15 se identificó basándose en la PCR de diagnóstico con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATACCACCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

25 5'-TGGTGGTCTAGAATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

30 mediante Redtag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 64°C, 2 min; 70°C 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y la proteína IL15 humana madura en el vector de pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-hULL15 que comprendía la secuencia siguiente: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL-15 humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-hULL15), que se muestra en la Figura 3A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-hULL15 y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 3B** y **Figura 3C**, respectivamente.

Ejemplo 4 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/hULL15R α ΔE3 en un vector de expresión. (de referencia)

40 El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15R α humano que contenía la región codificante y una porción de las regiones limítrofes 5' y 3' se amplificó a partir del ARN total de las PBMC con el cebador directo

5'-AGTCCAGCGGTGTCCTGTGG -3'

y el cebador inverso

5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'

45 mediante SUPERSRIPT III One-Step RT-PCR Platinum Tag HiFi (Invitrogen) de acuerdo con las siguientes condiciones: para RT; 55°C, 30 min; 94°C, 2 min; para amplificar ADNc; 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 72°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 5 min. El producto de ADNc de la PCR de IL15R α humano de 970 pb se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen del dominio extracelular de IL15 R α humano se amplificó a partir del ADNc de IL15R α humano de 970 pb con el cebador directo

50 5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

y el cebador inverso

5'-TGACGCGTTTAAGTGGTGTGCGCTGTGCCCTG-3'

5 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 72°C 2 min; x35 ciclos, 72°C, 10 min. El gen del dominio extracelular de IL15 R α humano se purificó en gel y se clonó en el vector lanzadera, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Vector (Invitrogen), mediante reacción TOPO de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon que contenía el inserto del gen del dominio extracelular IL15R α humano correcto se seleccionó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN con el GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un Quick Start Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó que el gen era el gen del dominio extracelular de IL15R α Δ E3 humano. El gen del dominio extracelular de IL15R α β E3 humano se retiró del vector lanzadera mediante digestión con HpaI y MluI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio extracelular de IL15R α Δ E3 humano en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR/huIL15R α que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - dominio extracelular de IL15 R α Δ E3. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Δ E3), mostrado en la **Figura 4A**, que contiene el inserto del gen del dominio extracelular de IL15R α Δ E3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/huIL15R α Δ E3 y de la proteína se muestran en **Figura 4B** y la **Figura 4C**, respectivamente.

Ejemplo 5 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huIL15R α Sushi en un vector de expresión. (de referencia)

20 El ARN total de las PBMC se preparó como se ha descrito anteriormente. El gen de IL15R α Sushi humano se amplificó a partir del ADNc de IL15R α humano de 970 pb (véase el Ejemplo 3) con el cebador directo

5'-TGGTTAACATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'

y el cebador inverso

5'-TTGTTGACGCGTTTATCTAATGCATTTGAGACTGG-3'

25 mediante PfuULTRA (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1 min; 70°C, 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de PCR del gen IL15R α Sushi humano se purificó en gel y se digirió con HpaI y MluI. El gen se ligó en pNEF38-c264scTCR que había sido digerido con HpaI y MluI. La clonación del fragmento de ADN que codificaba el dominio IL15R α Sushi humano en el vector de pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR/huIL15R α que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - IL15R α Sushi humano. El vector resultante, mostrado en la **Figura 5A**, que contenía el inserto del gen IL15R α Sushi humano correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen c264scTCR/huIL15R α Sushi y de la proteína se muestran en la **Figura 5B** y la **Figura 5C**, respectivamente.

35 Ejemplo 6 - Construcción de la fusión génica c264scTCR/huIL15R α Sushi que contiene una región bisagra de IgG1 humana mutada en un vector de expresión. (de referencia)

40 Construcción del vector de pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Sushi se describió anteriormente. Una región bisagra mutada de la cadena H de IgG1 humana, en la que tres residuos de cisteína se habían remplazado por tres residuos de serina se utilizó para conectar c264scTCR y huIL15R α Sushi. La región de bisagra se mutó, se amplificó, se ligó, y se verificó como antes. El huIL15R α Sushi se amplificó a partir del vector pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Sushi descrito anteriormente con el cebador directo

5'-TAATAAACGCGTATCACGTGCCCTC-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG -3'

45 mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 30 s; 65°C, 30 seg; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de ADNc de la PCR de huIL15R α Sushi de 250 pb se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló. El producto de ADNc se purificó a partir de la agarosa con un Kit de Extracción de Gel Qiaquick (Qiagen). El gen huIL15R α Sushi se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR que contenía el gen de la bisagra mutado que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el inserto del gen de huIL15 se identificó basándose en la PCR de diagnóstico de con el cebador directo

5'-TGGTGGGTTAACGAGCCCAAATCTTCTG-3'

y el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGATTATCATCTAATGCATTTG -3'

mediante RedTag (Sigma) en las siguientes condiciones: 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 70°C 1 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. La secuencia del clon correcto se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye Termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de ADN que codifica la región bisagra de IgG1 humana mutada y proteína IL15R α Sushi humana en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado una fusión génica c264scTCR-hmt-huL15R α Sushi que comprendía la siguiente secuencia: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15R α Sushi humano. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-huL15R α Sushi), que se muestra en la Figura 6A, se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación de ADN. Las secuencias del gen de fusión c264scTCR-hmt-huL15R α Sushi y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la Figura 6B y la Figura 6C, respectivamente.

Ejemplo 7 - Construcción de los genes c264scTCR/huL15R α Sushi y c264scTCR/huL15 en un único vector de expresión. (de referencia)

Para lograr la expresión de dos proteínas de fusión en una única célula anfitriona, los genes que codificaban c264scTCR/huL15R α Sushi y c264scTCR/huL15 se clonaron en un único vector de expresión. El gen c264scTCR/huL15R α Sushi se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 5 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo 5'-TGAGTGTCCGGAACCCATGGAGACAGACAC-3' y el cebador inverso 5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCATCTAATGCATTTGAG-3' en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min ; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15R α Sushi se purificó en gel, se digirió con BspEI y NotI y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con BspEI y NotI. El vector de expresión pSUN34R1 contiene dos sitios de clonación de genes de interés, así como regiones reguladoras/potenciadoras 5', regiones reguladoras y promotoras de la transcripción, secuencias reguladoras/de inicio/terminación de la traducción que incluyen una secuencia consenso de Kozak y una región de terminación poli-A, y un intrón y regiones 3' con elementos reguladores. Este vector también contiene secuencias de ADN que permiten el crecimiento selectivo en células de mamífero (promotor de SV40/gen neoR/poli-A) y bacterias (gen Ori/AMP). El vector que contiene el inserto del gen c264scTCR/IL15R α Sushi correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/huL15 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 2 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo

5'-TGAGTGATCGATAACCACCCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TGAGTGTTCAATTATCAAGAAGTGTGATGAAC-3'

en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15 se purificó en gel, se digirió con ClaI y Csp45I y se ligó en el vector de expresión pSUN34R1-c264scTCR/huL15R α Sushi que había sido digerido con ClaI y Csp45I. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15R α Sushi), mostrado en la **Figura 7**, que contenía el inserto del gen c264scTCR/huL15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/huL15R α Sushi y c264scTCR/huL15.

Ejemplo 8 - Construcción de los genes c264scTCR/huL15R α Δ E3 y c264scTCR/huL15 en un único vector de expresión. (de referencia)

El gen de fusión c264scTCR/huL15R α Δ E3 se amplificó a partir del molde descrito en el Ejemplo 4 mediante PfuUltra (Stratagene) con el cebador directo

5'-TGAGTGTCCGGAACCCATGGAGACAGACAC-3'

y el cebador inverso

5'-TTGTTGGCGGCCGCTTATCAAGTGGTGTGCTG-3'

en las siguientes condiciones: 94°C, 1 min; 68°C, 1 min; 72°C, 2 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. El producto de la PCR del gen c264scTCR/huL15R α Δ E3 se purificó en gel, se digirió con BspEI y NotI y se ligó al vector de expresión pSUN34R1 que había sido digerido con BspEI y NotI. El vector que contenía el inserto del gen c264scTCR/huL15R α Δ E3 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante secuenciación del ADN. El gen c264scTCR/huL15 se amplificó y se clonó en el vector de expresión descrito en el Ejemplo 7. El vector resultante (pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15R α Δ E3), mostrado en la **Figura 8**, que contiene el inserto del gen c264scTCR/huL15 correcto se identificó basándose en la PCR de diagnóstico y se volvió a confirmar mediante la secuenciación del ADN. Este vector contiene ambos genes c264scTCR/huL15R α Δ E3 y c264scTCR/huL15.

Ejemplo 9 - Generación de líneas celulares anfitrionas transfectadas que producen proteínas de fusión. (de referencia)

Los vectores de expresión se pueden introducir en una variedad de líneas de células anfitrionas mediante varios métodos diferentes de transformación, transfección o transducción. En uno de tales métodos, se sembraron células CHO-K1 (5×10^4) en una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche en una incubadora con CO_2 . Las células se transfectaron con 5 μg de vector de expresión que contenía los genes de fusión TCR/IL15 y/o TCR/IL15R α utilizando 10 μl de reactivo Mirus TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se seleccionaron con 4 mg/ml de G418 (Invitrogen) un día después de la transfección. Las células resistentes a G418 se expandieron y las células que expresaban la proteína de fusión con TCR fueron enriquecidas mediante 3-5 rondas de selección de MACS como se describe a continuación. Las células se desprendieron en EDTA 10 mM y se lavaron una vez con IMDM que contenía FBS al 10%. Las células se resuspendieron (10^7 células en 100 μl) y se incubaron con 5 μg de reactivo de tetrámero de p53 conjugado con R-ficoeritrina (PE) (aa264-272)/HLA-A2 durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se incubaron con cuentas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 15 min a 4°C. Las células se cargaron a una columna magnética (en un campo magnético) y las células no unidas se eliminaron con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5%). Las células unidas a la columna se hicieron eluir con IMDM que contenía FBS al 10% después de que la columna se hubiera retirado del campo magnético. Este procedimiento permite el enriquecimiento de las células que expresan la proteína de fusión basándose en la presentación transitoria de la proteína de fusión soluble sobre la superficie celular durante el proceso de producción/secreción. La asociación en la superficie de la célula de las proteínas de fusión se controló después de cada enriquecimiento. Los niveles de proteínas de fusión unidas a la superficie celular determinados mediante citometría de flujo se compararon con los niveles de proteínas de fusión solubles presentes en el medio de cultivo celular según se determinó mediante ELISA. Un ejemplo de la comparación se muestra en la **Figura 9A** y **9B**. En este ejemplo, células CHO-K1 transfectadas con pNEF38-c264scTCR/huIL15R α Sushi se enriquecieron por medio de MACS de una a cinco veces y a continuación se sembraron (1×10^6 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos. Al cabo de 24 horas, las células se desprendieron después de EDTA 10 mM, se lavaron una vez con IMDM + FBS al 10%, y se tiñeron (2×10^5 células/100 μl de IMDM + FBS al 10%) con 0,6 μg de tetrámero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 o la misma cantidad de tetrámero de CMVpp65 (aa495-503) conjugado con PE/HLA-A2 de 30 min a 4°C. Las células se lavaron una vez y se analizaron para determinar los niveles de proteína de fusión soluble asociada a la superficie celular mediante citometría de flujo, como se muestra en la **Figura 9A**. El nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo celular también se determinó mediante ELISA específico de TCR con un anticuerpo de captura, anticuerpo anti-TCR C β humano (BF1), y un anticuerpo de detección, anticuerpo anti-TCR C β humano biotinilado (W4F) descrito previamente (5), como se muestra en la **Figura 9B**. Los resultados indican que el proceso de enriquecimiento basado en cuentas magnéticas produjo transfectantes que producían un aumento de los niveles de proteína de fusión soluble. Las células transfectadas enriquecidas se subclonaron a continuación tres veces mediante dilución limitante y las líneas celulares de producción se escrutaron basándose en el nivel de proteína de fusión soluble secretada al medio de cultivo (determinado mediante el ELISA descrito anteriormente). Las líneas celulares de producción se expandieron y se cultivaron en IMDM + FBS al 10% o medio libre de suero en condiciones (p. ej., matraces, centrifugas, fermentadores, bolsas, botellas) adecuadas para generar la proteína de fusión soluble.

En algunos casos, las células anfitrionas se co-transfectaron con diferentes vectores de expresión para generar transfectantes capaces de expresar múltiples proteínas de fusión. Los transfectantes que expresaban una proteína de fusión también pudieron ser transfectados de nuevo con un uno o más vectores de expresión para generar transfectantes que expresaban múltiples proteínas de fusión. Las células también se transfectaron con un vector de expresión que contenía más de un gen de proteínas de fusión, como se ilustra en los Ejemplos 7 y 8, para generar un transfectante que expresa múltiples proteínas de fusión. Las células resultantes se pudieron utilizar para producir los complejos de proteínas de fusión de múltiples componentes de la invención como moléculas solubles en el medio de cultivo celular.

También se pudieron lograr altos niveles de producción de proteína de fusión o de complejo de proteína de fusión a través de métodos de transfección y selección celulares descritos en U.S.S.N. 09/204.979.

Ejemplo 10 - Purificación de las proteínas de fusión o complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R α . (de referencia)

Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles se pueden purificar a partir de las células anfitrionas o los medios de cultivo celulares utilizando una variedad de métodos, incluyendo partición selectiva o solubilidad en disolventes o mediante separación (es decir, a través de cromatografía) basándose en la carga, el carácter hidrófobo, el carácter hidrófilo, el tamaño, y/o la unión selectiva o semiselectiva a un ligando. Las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión solubles se pueden generar a partir de materiales insolubles a través del uso de condiciones de plegamiento de proteínas apropiadas. En un ejemplo, la proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se purificó del medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo (BF1) que reconocía el dominio TCR-C β humano. Típicamente, una columna que contenía Sefarosa conjugada con BF1 se equilibró primero con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (tampón de carga) y después se cargó a 2 ml/min con medio de cultivo celular de pH ajustado que contenía la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. A continuación, la columna se lavó con 5 veces el volumen de la columna de tampón de carga para eliminar las proteínas no unidas, y la

proteína de fusión de c264scTCR/IL15 se hizo eluir con 4 veces el volumen de la columna de citrato de Na 0,5 M, pH 4. Después de la recogida, el eluato se ajustó a pH 8,0 por medio de Tris-HCl 2 M, pH 8,0. La proteína purificada se cambió de tampón a PBS y se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm. La columna BF1 se vació con glicina-HCl 50 mM, pH 3,0, y se almacenó en etanol al 20% a 4°C para su uso posterior. La proteína de fusión se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico y/o de exclusión por tamaño. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían las proteínas de fusión de c264scTCR/IL15, c264scTCR/IL15RαSushi y c264scTCR/IL15RαΔE3 se purificaron mediante los métodos anteriores y las muestras de fusión purificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras y seguido de tinción con azul brillante de Coomassie. Los ejemplos de tales geles se muestran en la Figura 10. Las principales bandas de proteínas corresponden a los pesos moleculares correctos esperados basándose en las secuencias de las proteínas de fusión.

Ejemplo 11 - Generación de un complejo de proteína de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Rα. (de referencia)

IL15 se une específicamente al dominio extracelular de IL15Rα con una alta afinidad (4). De este modo se puede formar un complejo de proteínas de fusión que porta los dominios de IL-15 e IL15Rα en una variedad de condiciones, incluyendo dentro de la célula expresión o extracelularmente con proteínas de fusión no purificadas o purificadas. En un ejemplo, se pueden mezclar cantidades molares iguales de proteínas de fusión purificadas en las condiciones apropiadas (es decir, 10 min a temperatura ambiente) para formar un complejo de proteína de fusión. La formación de complejos se puede verificar utilizando una variedad de técnicas que incluyen análisis de unión directa, análisis de unión competitiva, inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, o análisis basados en el tamaño, la actividad u otras propiedades del complejo. Por ejemplo, como se muestra en la **Figura 11**, la cromatografía de exclusión por tamaño puede verificar la formación de complejos que comprenden las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15RαSushi basándose en el peso molecular. En este estudio, se cargaron aproximadamente 100 µg de c264scTCR/huIL15 (0,5 mg/ml) en una columna Superdex 200 HR 10/30 para el análisis. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15 es de aproximadamente 57 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11A**), el peso molecular estimado es de aproximadamente 98 kD, lo que sugiere que es probable que esta proteína de fusión sea un monómero. Del mismo modo, se cargaron aproximadamente 60 µg de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15RαSushi (0,3 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15RαSushi es de aproximadamente 52 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 11B**), el peso molecular estimado de la proteína de fusión es de aproximadamente 81 kD, lo que sugiere de nuevo que esta proteína de fusión es un monómero. El análisis SEC anterior de otras proteínas de fusión basadas en TCR mostró diferencias similares entre el peso molecular monomérico calculado y el peso molecular estimado de la proteína de fusión glicosilada. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15RαSushi se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 126 µg de las proteínas mezcladas (0,63 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil mostrado en la **Figura 11C**. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno a aproximadamente 170 kD, que es un heterodímero de las dos proteínas de fusión y otro a aproximadamente 91 kD, que es probablemente una mezcla de formas monoméricas de las proteínas de fusión. De este modo, la aparición de la especie de 170 kD en la preparación de las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RαSushi mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de la proteína de fusión de la invención.

También se llevó a cabo análisis del complejo de proteínas de fusión que comprendía las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15RαΔE3. Se cargaron aproximadamente 100 µg de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15RαΔE3 (0,5 mg/ml) en la columna Superdex. El peso molecular calculado para c264scTCR/huIL15RαΔE3 es de aproximadamente 60 kD. Basándose en el perfil SEC (**Figura 12A**), el peso molecular estimado de la proteína es de aproximadamente 173 kD, lo que sugiere que esta proteína existe como un homodímero. Cuando las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 y c264scTCR/huIL15RαΔE3 se mezclaron en cantidades molares iguales y se cargaron aproximadamente 118 µg de las proteínas mezcladas (0,59 mg/ml) en la columna, se obtuvo el perfil que se muestra en la Figura 12B. Se estimaron los pesos moleculares de los dos picos principales: uno es >210 kD, que es probablemente un tetrámero compuesto por dos heterodímeros y el otro es de aproximadamente 93 kD, que es probable que sea un monómero de c264scTCR/huIL15. De este modo, la aparición de la especie de 170 kD en la preparación de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15RαΔE3 mezcladas es una evidencia de que se puede generar el complejo de la proteína de fusión de la invención.

Ejemplo 12 - El complejo de proteína de fusión de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15Rα muestra una mayor unión a los complejos de péptido/MHC. (de referencia)

Los complejos de proteínas de fusión generados como se ha descrito anteriormente se caracterizan por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban este antígeno, se cargaron células T2 HLA-A2.1 positivas con el péptido p53 (aa264-272) a 26°C durante la noche y después se almacenaron a 5×10^6 células/ml en nitrógeno líquido. Las células T2 que no se incubaron con péptido sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con el péptido p53 o de control se descongelaron y se resuspendieron en 1 ml de IMDM + FBS al 10%. Las células ($5 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) se tiñeron a continuación durante 30 min a RT con 0,5 µg de las proteínas de fusión siguientes: c264scTCR/huIL15,

c264scTCR/huIL15R α Sushi, complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,1 μ g de anticuerpo anti-TCR C β humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100 μ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5 μ g de estreptavidina conjugada R-Ficoeritrina en 100 μ l de tampón de lavado durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para el análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 13**, cada una de las proteínas de fusión fue capaz de teñir específicamente las células cargadas con péptido p53. Además, el complejo proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi presentó una mayor unión específica a través de los dominios c264scTCR multivalentes a los complejos de p53(aa264-272)/HLA-A2.1 presentados sobre las células T2. En particular, el complejo de proteína de fusión dimérica mostró una mejor tinción de las células T2 cargadas con péptido p53 que las proteínas de fusión monoméricas c264scTCR/huIL15 o c264scTCR/huIL15R α Sushi. Estos datos sugieren que el complejo de proteína de fusión multimérica proporcionará mejores propiedades de reconocimiento del antígeno que la forma monomérica de las proteínas de fusión.

Ejemplo 13 - Generación de genes mutantes de huIL-15 y construcción de vectores de expresión de genes mutantes de c264sc TCR-hmt-huIL15 de referencia.

Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi son capaces de formar un complejo a través de interacciones de los dominios de IL-15 e IL-15R α y el complejo de proteína de fusión multivalente ha mejorado de unión para los complejos de péptido/MHC. Tal complejo de proteína de fusión tiene ventajas como agente de búsqueda específico de antígeno o dirigido, de diagnóstico y terapéutico basadas en la actividad de unión mejorada. La capacidad de los dominios de IL-15/IL-15R α de la proteína de fusión para unirse a células que expresan los receptores de IL-15 también es una característica deseable como se indica en la presente memoria. Sin embargo, existen aplicaciones en las que resulta ventajoso aumentar o disminuir la capacidad de los dominios de IL-15/IL-15R α para interactuar con y/o afectar a las respuestas de las células que expresan los receptores de IL15. Por ejemplo, puede ser deseable reducir esta interacción en las aplicaciones (es decir, usos de búsqueda y de diagnóstico), en las que el objetivo principal es la utilización del complejo de proteína de fusión para la detección específica de los complejos de péptido/MHC. En aplicaciones terapéuticas, también puede ser deseable que los complejos de proteínas de fusión generados contengan dominios de IL-15 capaces de aumentar o disminuir las respuestas mediadas por IL-15. Para abordar esta cuestión, se llevó a cabo el análisis mutacional para identificar los residuos de IL-15 que afectan a su unión al complejo de IL-2/15R $\beta\gamma_c$ sin afectar a sus interacciones con IL-15R α . Las mutaciones resultantes pueden crear variantes de IL-15 incluyendo antagonistas o agonistas. Además del uso de las proteínas de fusión de la invención, los antagonistas y agonistas de IL-15 resultantes también pueden tener utilidad como citoquinas solubles (es decir, proteínas de no fusión) o como un complejo con dominios de IL-15R α , para aplicaciones de búsqueda, diagnóstico o terapéuticas. Por ejemplo, los antagonistas de IL-15 antagonistas pueden ser útiles en la supresión de respuestas inmunitarias no deseadas, mientras que los agonistas de IL-15 se pueden utilizar para estimular respuestas inmunitarias en estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Basándose en la comparación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura de IL-15 con IL-2, se identificaron varios aminoácidos que podrían afectar potencialmente a las interacciones entre IL-15 e IL-15R α , IL-15R β y/o γ_c . Como se muestra en la **Figura 21** y en la **Figura 14A**, se crearon variantes de IL-15, en la que los posibles sitios de unión de la proteína de IL-15 humana madura a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$, aminoácidos en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 (numeración basada en la secuencia de IL-15 humana nativa madura), fueron sustituidos cada uno o en combinación con dos o más sustituciones distintas. El ácido aspártico de la posición 8 se sustituyó por alanina o asparragina. El ácido aspártico en la posición 61 se sustituyó por alanina. La asparragina de la posición 65 se sustituyó por alanina o ácido aspártico. La asparragina de la posición 72 se sustituyó por arginina o ácido aspártico. La glutamina de la posición 108 se sustituyó por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Gln de la posición 108 se sustituyeron cada uno por alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una asparragina o alanina. Tanto el Asp de la posición 8 como la Asn de la posición 65 se sustituyeron cada uno por una serina o arginina. Para generar mutantes de IL-15, se utilizó la PCR solapante.

Por ejemplo, para generar el Asp de la posición 8 con la sustitución de residuos alanina o asparragina, se utilizó el vector pNEF38-c264scTCR/huIL15 como molde para amplificar dos fragmentos solapantes de ADN-c con el cebador directo para el fragmento 1

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 1

5'-AGATCTTCAATTTTTTCAAMKHACTTATTACATTCACCCAG-3'

y con el cebador directo para el fragmento 2

5'-ACTGGGTGAATGTAATAAGTDMKTTGAAAAAATTGAAGATC-3'

y con el cebador inverso para el fragmento 2

5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG-3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x35 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). Los productos de ADNc de la PCR de los fragmentos 1 y 2 se fusionaron entre sí mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 66°C, 1,5 min; 72°C 1,5 min; x10 ciclos. El fragmento de ADNc de la PCR solapante se amplificó con el cebador directo

5'-TGGTGGACGCGTAACTGGGTGAATG-3'

y con el cebador inverso

5'-TGGTGGTCTAGATTATCAAGAAGTGTGATG -3'

mediante PfuUltra (Stratagene) en las siguientes condiciones de PCR: 94°C, 1 min; 64°C, 1,5 min; 69°C 1,5 min; x30 ciclos; 72°C, 10 min. Los productos de ADNc de la PCR de hUL-15 mutante se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aislaron. El producto de ADNc se purificó de la agarosa con un Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen). El gen de hUL15 mutante se digirió con MluI y XbaI y se ligó en pNEF38-c264scTCR-hmt que había sido digerido con MluI y XbaI. El clon que contenía el gen de hUL15 de la posición 8 con una sustitución de alanina o asparragina se verificó mediante secuenciación de ADN con GenomeLab Dye termination Cycle Sequencing con un QUICK START KIT (Beckman Coulter) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El vector de expresión pNEF38-c264scTCR se ha descrito anteriormente. La clonación del fragmento de ADN que codificaba la proteína IL-15 humana mutada en el vector pNEF38-c264scTCR dio como resultado un gen de fusión c264scTCR-hmt-hUL15D8A o c264scTCR-hmt-hUL15D8N que comprendía la secuencia siguiente: 3' - líder de la cadena ligera de inmunoglobulina - 264 TCR V- α - conector peptídico - 264 TCR V- β - TCR C- β humano - bisagra de IgG1 humana mutada - IL15D8A humana o -IL15D8N humana. El vector resultante (pNEF38-c264scTCR-hmt-hUL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-hUL15D8N), mostrado en la **Figura 14B**, se confirmó mediante secuenciación del ADN. Las secuencias del gen de fusión pNEF38-c264scTCR-hmt-hUL15D8A o pNEF38-c264scTCR-hmt-hUL15D8N y de la proteína (incluyendo la secuencia líder) se muestran en la **Figura 14C** y en la **Figura 14D**, respectivamente.

Se introdujeron otras mutaciones de una manera similar y se construyó un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Los vectores de expresión se introdujeron en células CHO.K1 para generar transfectantes estables como se describe en el Ejemplo 9. La producción y purificación de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 se llevaron a cabo usando métodos similares a los descritos en los Ejemplos 10 y 11. La generación de variantes de IL-15 como citoquinas solubles se puede llevar a cabo a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo la producción en sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos (véanse, p. ej., el documento WO9527722; Hsu et al. 2005 J. Immunol. 175:7226).

Ejemplo 14 - Caracterización funcional de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R α (de referencia)

La unión funcional del dominio TCR de la proteína de fusión se demostró basándose en el ELISA y los métodos de tinción celular utilizando los reactivos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 descritos en el Ejemplo 9 y los métodos de tinción de células presentadoras de antígeno de descritos en el Ejemplo 12. La capacidad de los dominios de IL15 e IL15R α de la proteína de fusión para interactuar se demostró como se describe en el Ejemplo 11. Adicionalmente la actividad funcional de los dominios de IL15 e IL15R α se puede evaluar a través de una variedad de métodos, incluyendo la unión a receptores IL-2/15R $\beta\gamma_c$ o la modulación de la actividad de las células inmunitarias que portan los receptores de IL-15. En un ejemplo, las células CTLL-2, que expresan IL-15R (cadenas $\alpha\beta\gamma_c$) heterotrimérico, se incubaron con 0,5 μ g de las proteínas de fusión individuales: c264scTCR/hUL15, 264scTCR/hUL15R α Sushi, o complejo de c264scTCR/hUL15 + c264scTCR/hUL15R α Sushi durante 30 min a RT. Las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5 μ g de tetrámero de p53 (aa 264-272) conjugado R-ficoeritrina (PE)/HLA-A2 durante 30 min a RT. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis por medio de citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 15**, la asociación de la proteína de fusión de c264scTCR/hUL15 y el complejo de c264scTCR/hUL15 + c264scTCR/hUL15R α Sushi a través de sus dominios hUL15 con los receptores de IL-15 sobre las células CTLL-2 se puede detectar con el tetrámero de p53 (aa264-272) conjugado con PE/HLA-A2 que reconoce el dominio c264scTCR de la proteína de fusión unida. Estos resultados indican que los dominios tanto de IL-15 como de TCR de la proteína de fusión/complejos de proteína de fusión son capaces de interactuar funcionalmente con sus ligandos cognados.

Además, las células CTLL-2 son dependientes de citoquinas para el crecimiento y pueden responder a IL-15 humana recombinante. Se desarrolló un análisis de proliferación de WST-1 basado en células utilizando células CTLL-2 para evaluar la actividad biológica frente a IL-15 de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión. WST-1 (Roche) es un reactivo que se puede convertir en formazán por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. En el análisis de WST-1, la cantidad de formazán en el medio de cultivo medida por la cantidad de absorbancia 440-450 nm es directamente proporcional al número de células vivas

en el cultivo. Las células CTLL-2 (2×10^4 / 200 μ L) se incubaron con las concentraciones indicadas de las proteínas de fusión (0-28 ng/ml): c264scTCR/huIL15, complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi o complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Δ E3 durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en una incubadora con CO₂. Las células se incubaron con 10 μ L de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 100 μ L de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440-450 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en **Figura 16**, la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 a una concentración tan baja como 1,8 ng/ml ($\sim 31,25$ pM), lo que sugiere la activación de las células CTLL-2 con la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 a través del receptor de IL15 de alta afinidad. Curiosamente, los complejos de proteínas de fusión también apoyaron proliferación de células CTLL-2, pero en un menor grado lo que sugiere que la actividad estimuladora de c264scTCR/huIL15 era inhibida tras la formación del complejo con c264scTCR/huIL15R α Sushi o c264scTCR/huIL15R α Δ E3 (una vez o cuatro veces, respectivamente). Esto sugiere que la unión de c264scTCR/huIL15 al receptor de IL-15 de alta afinidad es inhibida por las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15R α Sushi o c264scTCR/huIL15R α Δ E3. Estos resultados proporcionan evidencia de que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión pueden activar o suprimir las respuestas de las células inmunitarias en diferentes condiciones.

Se llevaron a cabo análisis similares con líneas celulares que expresaban solamente los receptores de IL-15 $\beta\gamma_c$ de afinidad intermedia, tales como las líneas celulares 32D β (véase más abajo). En algunos casos, es posible que la actividad biológica de IL15 en la estimulación de la proliferación de las células que portan IL-15R sea mejorada cuando ésta se encuentra en un complejo con el dominio de IL15R α (1-3). Se evaluará la estimulación de la proliferación celular por los complejos de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi o c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Δ E3 y puede proporcionar una evidencia adicional de que los complejos de proteína de fusión pueden estimular o activar la respuesta inmunitaria de las células inmunitarias.

Ejemplo 15 - Los complejos de proteínas de fusión diméricas de las variantes TCR/IL15R α Sushi y TCR/IL15 exhiben una unión específica de TCR al complejo de péptido/MHC pero menos unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$. (de referencia)

Los complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 descritos anteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse al antígeno específico de TCR, p53 (aa264-272)/HLA-A2.1. Para generar células que presentaban p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, se cargaron células T2 positivas para HLA-A2.1 (2×10^6 mL) con péptido p53 (aa264-272) 20 mM a 37°C en presencia de $1 \times$ PLE (Altor Bioscience) durante 2-3 horas. Las células T2 que no se incubaron con el péptido y las células 32D β que expresaban IL-2/15R $\beta\gamma_c$ sirvieron como controles. Las células T2 cargadas con péptido p53, las células T2 de control, o las células 32D β (2×10^5 / 100 μ L) se incubaron a continuación durante 30 min a 4°C con 320 nM de los siguientes complejos de proteínas de fusión diméricas: 1) c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi, 2) c264scTCR/huIL15D8A + c264scTCR/huIL15R α Sushi, y 3) c264scTCR/huIL15D8N + c264scTCR/huIL15R α Sushi. Estos complejos se generaron incubando 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 purificada y 160 nM de proteína de fusión de c264scTCR/huIL15R α Sushi purificada a 4°C durante 3 horas: Después de la tinción, las células se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,05%) y se tiñeron con 0,5 μ g de anticuerpo anti-TCR C β humano monoclonal biotinilado de ratón (BF1) en 100 μ L de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se tiñeron con 0,5 μ g de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina en 100 μ L de tampón de lavado durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y se resuspendieron para su análisis mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 17A**, el complejo de c264scTCR/huIL15D8A + c264scTCR/huIL15R α Sushi y el complejo de c264scTCR/huIL15D8N + c264scTCR/huIL15R α Sushi exhibieron una actividad equivalente a la del complejo c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi para teñir específicamente las células T2 cargadas con péptido p53. Estos resultados indican que los dominios scTCR multivalentes son completamente funcionales en cada uno de estos complejos de fusión. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 17B** y la **Figura 17C**, los complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutantes mostraron una menor tinción de fondo en las células T2 de control (**Figura 17B**) y en las células 32D β positivas para IL-15R $\beta\gamma_c$ (**Figura 17C**) que el complejo de proteína de fusión de c264scTCR/IL15 de tipología amplia. Así, estos complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 (D8a y D8N) no muestran actividad de unión a los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$ presentes en las células 32D β . Se llevaron a cabo estudios similares de unión al receptor IL-15R $\beta\gamma_c$ con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los resultados indican que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de la invención que comprenden variantes de IL-15 conservan la actividad para reconocer complejos de péptido/MHC y muestran una actividad de unión menor o mayor de los receptores IL-15R $\beta\gamma_c$.

Para confirmar los dominios TCR e IL-15 funcionales de las proteínas de fusión anteriores, se midió la actividad de unión del péptido/MHC e IL-15R α mediante un análisis ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron previamente con BF1 20 nM, un anticuerpo anti-TCR C β , o TCR/IL15R α Sushi 20 nM en tampón carbonatada de pH 9,1 (bicarbonato de sodio 35 mM, Na₂CO₃ 17,5 mM, NaCl 50 mM) durante 3 horas a 4°C. Las placas se lavaron con tampón de lavado (imidazol 40 mM, NaCl 150 mM) 4 veces y se bloquearon con BSA-PBS al 1% durante 10 minutos. Se añadieron las proteínas de fusión indicadas a una concentración de 0,03 - 4 nM a las placas y se incubaron a RT durante 30 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces. Las proteínas de fusión capturadas con BF1 se incubaron con 1 μ g/ml de tetrámero de p53 conjugado con HRP/HLA-A2.1 durante 45 minutos a RT y las proteínas de fusión capturadas con TCR/IL15R α Sushi se incubaron con 50 ng/ml de anti-IL-15

humana biotinilada de ratón durante 30 minutos a RT. Después de lavar 4 veces, la placa incubada con anti-IL-15 humana biotinilada de ratón se incubó con 0,25 µg/ml de HRP-estreptavidina durante 15 minutos. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron con sustrato de peroxidasa ABT durante 1-10 minutos y se desarrollaron para la medición de absorbancia a 405 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 18^a** y en la **Figura 18^B**, las proteínas de fusión compartieron una actividad de unión específica de TCR similar para el tetrámero p53/HLA-A2 y una actividad de unión a IL-15 equivalente para IL15RαSushi. Se llevaron a cabo estudios similares de la unión de IL-15Ra con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los resultados indican que las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 conservan la actividad para reconocer los complejos de péptido/MHC y los receptores IL-15Ra.

Ejemplo 16 - Caracterización funcional de las proteínas de fusión y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 mutante (de referencia)

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas de fusión que comprenden un antagonista o agonista de IL-15 pueden ser útiles como agentes dirigidos para inhibir o estimular las respuestas mediadas por IL-15 (es decir, actividad de células T o células NK) en el sitio de la enfermedad. Para determinar la bioactividad frente a IL-15 de estas proteínas de fusión para afectar a las respuestas inmunitarias, se llevaron a cabo estudios de proliferación de células con células CTLL-2 que expresaban IL-15R (cadenas αβγ_c) de alta afinidad y con células 32Dβ que expresaban IL-15R (cadenas βγ_c) de afinidad intermedia. Las células (2 x 10⁴/200 µL) se incubaron con 0,4-40 nM de las proteínas de fusión de TCR/IL15 descritas anteriormente durante 3 días en placas de 96 pocillos a 37°C en una incubadora con CO₂. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19A** y en la **Figura 19B**, la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15 que comprende el dominio de IL-15 de tipo salvaje puede apoyar la proliferación de células CTLL-2 y 32Dβ a una concentración tan baja como 40 pM o 1 nM, respectivamente. Curiosamente, la proteína de fusión que comprende una variante de IL15 con una sustitución de asparragina a ácido aspártico en la posición 72 con un aminoácido (c264scTCR/huIL15N72D) era mucho más activa que la proteína de fusión que comprendía el dominio de IL-15 de tipo salvaje al apoyar la proliferación de la línea celular 32Dβ, que muestra la actividad biológica a una concentración tan baja como 80 pM (**Figura 19B**). En este sentido, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-15 (huIL15N72D) mostró una actividad súperagonística. En un complejo con c264scTCR/IL15RαSushi a una razón uno a uno, c264scTCR/huIL15N72D tenía una capacidad de unión similar a la de c264scTCR/huIL15wt al complejo de p53/HLA-A2.1 en células T2 (**Figura 17A**), pero mostró una mayor capacidad de unión a los receptores IL-15Rβγ_c sobre las células 32Dβ (**Figura 17C**). En contraste, las proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 con sustituciones de la posición 8 (c264scTCR/huIL15D8N o c264scTCR/huIL15D8A), en la posición 65 (c264scTCR/huIL15N65A), en la posición 108 (c264scTCR/huIL15Q108A), o una sustitución diferente en la posición 72 (c264scTCR/huIL15N72R) fueron menos activas en el apoyo a la proliferación de las células tanto CTLL-2 como 32Dβ en comparación con la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15wt (**Figura 19A y Figura 19B**). Se llevaron a cabo estudios similares de la actividad proliferativa dependiente de IL-15 con otras proteínas de fusión que comprendían variantes de IL-15 y se resumen en la Figura 21. Los datos apoyan la hipótesis de que las mutaciones en las posiciones 8, 61, 65, 72 y 108 de la proteína IL-15 pueden dar como resultado antagonistas de IL-15 con disminución de la unión a IL-15R y poca o ninguna actividad para estimular la respuesta inmunitaria. Los resultados con las sustituciones en la posición 72 son inesperados, dado que un mutante (c264scTCR/huIL15N72R) actuó como antagonista de IL-15, mientras que un mutante diferente (c264scTCR/huIL15N72D) mostró un aumento de la unión a IL-15 R y mayor actividad en la estimulación de respuestas inmunitarias.

En una circunstancia típica, la IL-15 es trans-presentada por IL15Rα sobre la superficie de una célula dendrítica a los receptores IL-15Rβγ_c sobre una célula T de memoria, NKT, o NK para apoyar la supervivencia celular y estimular las respuestas inmunitarias. Un antagonista debe bloquear la trans-presentación de IL-15 uniéndose a IL15Rα. Para evaluar si las proteínas de fusión antagonistas pueden competir con c264scTCR/huIL15wt para bloquear su actividad para apoyar el crecimiento de células CTLL-2, se incubaron 4 x 10⁴ células CTLL-2 con 0,5 nM de c264scTCR/huIL15wt en presencia o ausencia de 50 nM (exceso molar de 100 veces) de diversas proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutante a 37°C en una incubadora con CO₂ durante 24 horas. Las células se incubaron con 10 µl de WST-1 durante 4 horas antes de recoger 150 µl de medio de cultivo para la medición de la absorbancia a 440 nm con un lector de placas de microtitulación. Como se muestra en la **Figura 19C**, la capacidad de c264scTCR/huIL15wt para apoyar la proliferación de células CTLL-2 fue totalmente bloqueada en presencia de 100 veces más de c264scTCR/huIL15D8N, c264scTCR/huIL15D8A, c264scTCR/huIL15D8A/Q108A, c264scTCR/huIL15Q108A, o c264scTCR/huIL15D8N/N65A, y se redujo 62% en presencia de la proteína de fusión de c264scTCR/huIL15N72R. Esto sugirió que estas proteínas de fusión eran los antagonistas de la proteína de fusión de c264scTCR/IL15. Estos datos indican que las proteínas de fusión de c264scTCR/huIL15 mutante eran antagonistas funcionales de la actividad de IL-15, como era de esperar basándose en la capacidad de estas proteínas para unirse a los receptores IL-15Rα pero no IL-15Rβγ_c.

Se llevarán a cabo estudios similares con otras proteínas de fusión de TCR/IL15 y variantes de IL-15 descritas en la presente memoria para demostrar la actividad antagónica y agonística de IL-15. Como se resume en la Figura 21, las sustituciones en las posiciones 8, 61, 65, 72, y 108 de IL-15 muestran la capacidad de afectar a la unión de IL-15 a IL-15R (cadenas βγ_c). Otras sustituciones en las posiciones 92, 101, y 111 de IL-15 también se evaluarán como

posibles sitios de unión para la interacción con IL-15R. Además, las combinaciones de los cambios que incluyen sustituciones en todos o varios de estos residuos pueden crear los antagonistas o agonistas de IL-15 eficaces. Incluyendo las moléculas descritas anteriormente, las variantes de IL-15 que se van a evaluar incluyen aquellas con cambios en la posición 8 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 61 a alanina, asparragina, serina, lisina, treonina, o tirosina; en la posición 65 a alanina, ácido aspártico, o arginina; en la posición 72 a alanina, ácido aspártico, o arginina; y en las posiciones 92, 101, 108, o 111 a alanina o serina.

Ejemplo 17 - Conjugación célula-célula y redireccionamiento de las células inmunitarias por las proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 y TCR/IL15R α . (de referencia)

Para demostrar que las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión pueden tender puentes entre las células que portan el receptor de IL-15 células diana que portan el péptido/MHC, se cargarán células T2 con péptido p53 (aa264-272) o péptido CMVpp65 (aa495-503) de control y a continuación se marcarán con dihidroetidio. Las células CTLL-2 se marcarán con calceína AM y las dos poblaciones de células marcadas se mezclarán y se incubarán en presencia o ausencia de las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión. En la ausencia de los complejos de proteínas de fusión o cuando las células T2 se cargaban con péptido de control, se prevé que las células permanezcan como dos poblaciones distintas según se evalúa por citometría de flujo. Sin embargo, cuando las células T2 se cargan con p53 (aa264-272) y se incuban con las células CTLL-2 en presencia de proteínas o complejos de fusión, la aparición de una población de células con doble tinción sería indicativa de conjugación de las células T2 con las células CTLL-2 a través de las proteínas de fusión o los complejos de proteínas de fusión.

Del mismo modo, se pueden llevar a cabo estudios para demostrar que los complejos de proteínas de fusión pueden tender puentes entre células inmunitarias que portan el receptor de IL-15 y células diana que portan el péptido/MHC y dirigir la citotoxicidad inmunitaria contra las células diana. Por ejemplo, las células T2 se cargarán con péptido p53 (aa264-272) o péptido CMVpp65 (aa495-503) de control y a continuación se marcarán con calceína AM. Las células efectoras inmunitarias que portan receptores de IL-15 (es decir, células NK o células T activadas) se mezclarán en diferentes proporciones y se incubarán en condiciones adecuadas (es decir 37°C durante 2-4 horas) en presencia o ausencia del complejo de proteína de fusión. La citotoxicidad se evaluará basándose en la liberación de calceína desde las células diana T2 al medio de cultivo mediante métodos convencionales. La liberación específica de calceína-AM se medirá o se comparará con el control no específico de calceína-AM liberada espontáneamente. En ausencia del complejo de proteína de fusión o cuando las células T2 se cargaron con el péptido de control, se esperaban bajos niveles de citotoxicidad para las células diana. Sin embargo, cuando las células T2 se cargan con p53 (aa264-272) y se incuban con las células efectoras inmunitarias en presencia del complejo de la proteína de fusión, la lisis específica de las células T2 sería una indicación de que las células efectoras inmunitarias son redireccionadas contra las células presentadoras del péptido p53 a través del complejo de proteína de fusión. Se llevarán a cabo estudios similares con líneas de células tumorales que presentan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 como células diana.

Ejemplo 18 - Demostración *in vivo* de los efectos antitumorales de agonistas de variantes de IL-15 y proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 de referencia

Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o agonistas de variantes de IL-15 tienen actividad anti-tumoral *in vivo*, se utilizó un modelo de tumor de xenoinjerto experimental. Se han empleado líneas de células tumorales humanas que expresan complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1, tales como melanoma A375, adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, carcinoma pancreático PANCI, en estudios de eficacia en animales similares utilizando otras proteínas de fusión basadas en TCR (5-7). Por ejemplo, se inyectarán células de melanoma humano A375 por vía subcutánea en el flanco de ratones carentes de sistema inmunitario y se permitirá que se establezcan los tumores durante tres días. A los ratones portadores de tumor se les inyectará por vía intravenosa complejo c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi o un agonista de variante de IL-15 (intervalo de dosis - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS, diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se medirá el tamaño del tumor y se calcularán los volúmenes del tumor. Se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con el complejo de proteína de fusión o el agonista de la variante de IL-15 sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Programas de dosificación alternativos, que incluyen la dosificación en múltiples ciclos también pueden demostrar la eficacia antitumoral de la proteína de fusión o el agonista de la variante de IL-15. Las líneas de células tumorales que carecen de complejos de p53 (aa264-272)/HLA-A2.1 (tales como HT-29 o AsPC-1 (5, 9)) se pueden utilizar como controles para el reconocimiento específico de antígenos por el dominio c264scTCR del complejo de proteína de fusión. Se podrían utilizar complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendían otros dominios de TCR (es decir, específicos para el péptido CMVpp65 (aa495-503) (9)) como controles de redireccionamiento no tumoral.

Además, se llevarán a cabo estudios de transferencia adoptiva de células en ratones portadores de tumores de xenoinjertos. Por ejemplo, se aislarán células inmunitarias que portan el receptor de IL-15, tales como esplenocitos no sometidos a tratamiento previo o activados (o de memoria), células NK o células T, de ratones y se incubarán con el complejo de c264scTCR/huIL15 + c264scTCR/huIL15R α Sushi o un variante de IL-15 agonística en condiciones que permitan la unión a las células. En algunos casos, se utilizarán el complejo de proteína de fusión o una variante

de IL-15 agonística para activar las células inmunitarias. Las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con los complejos de proteína de fusión se transferirán a continuación a ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores A375. Los controles incluirán la transferencia de las células inmunitarias no tratadas, el complejo de proteína de fusión solo y PBS. El crecimiento del tumor se controlará y se espera que todos los ratones tratados con PBS desarrollen tumores. La supresión del crecimiento del tumor o la regresión completa del tumor en algunos o en todos los ratones tratados con las células activadas con la variante de IL-15 o las células recubiertas con complejos de proteínas de fusión sería una indicación de un efecto antitumoral del tratamiento. Alternativamente, la variante de IL-15 o el complejo de proteínas de fusión y las células inmunitarias se administrarán al mismo tiempo, o por separado en los mismo momento o en momentos diferentes. Las células inmunitarias pueden ser autólogas o alogénicas en relación con el anfitrión portador de un tumor. El número de células transferidas y el programa de dosificación se variarán para evaluar y optimizar la eficacia antitumoral. Como se ha descrito anteriormente, se emplearán otras líneas tumorales o complejos de proteínas de fusión para determinar el papel del direccionamiento al antígeno en cualquier actividad antitumoral observada.

Ejemplo 19 - El tratamiento in vitro de células inmunitarias con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15: TCR/IL15R α seguido de transferencia adoptiva de células proporcionan una mejora de la supervivencia en el modelo animal de tumor por xenoinjerto (de referencia)

Para demostrar la eficacia anti-tumoral de las células NK de ratón alogénicas enriquecidas preincubadas con complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R α sobre el crecimiento del tumor, se llevó a cabo el siguiente estudio utilizando células tumorales NSCLC A549A2 humanas en un modelo de metástasis experimental en ratones carentes de sistema inmunitario.

A los ratones carentes de sistema inmunitario atímicos (n = 4 por grupo, hembra, 5-6 semanas de edad) se les inyectó por vía intravenosa (IV) a través de la vena lateral de la cola la línea de células tumorales NSCLC humana A549-A2 a 5×10^6 células/ratón. La línea celular A549-A2 representa un transfectante de la línea parental A549 positiva para p53 que porta un vector que expresa el ADNc de HLA-A2.1 humano.

Los bazos de los ratones A2 (fondo B6) se recogieron y las células NK se aislaron utilizando un kit de aislamiento de células NK de Miltenyi Biotec, Inc. de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó una suspensión de células individuales de esplenocitos mediante homogeneización de los bazos a través de un tamiz metálico (60 de malla) en HBSS. Los glóbulos rojos de la sangre se lisaron en tampón de lisis sangre roja ACK. Las células se incubaron con cóctel de biotina-anticuerpo (10 μ l para 10^7 células) durante 10 min a 4-8°C. Se determinó el número de leucocitos y se añadieron 30 μ l de tampón (PBS, pH 7,2, BSA al 0,5% y EDTA 2 mM) y 20 μ l de microcuentas anti-biotina por 107 células y la mezcla se incubó a 4-8°C durante 15 min. Las células se lavaron en 2 ml de tampón y se centrifugaron a 300xg durante 10 min. Las células se resuspendieron en 500 μ l de tampón para cargarlas en la columna MACS. Se recogió el flujo continuo y se determinó la pureza de las células NK utilizando el análisis FACSscan.

Con el fin de activar las células, las células NK (5×10^6) se cultivaron a 37°C durante la noche en presencia o ausencia de complejo de proteína de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α , proteína de fusión de TCR-IL2 o rhIL-2 en matraces T25 en 10 mL de RPMI 1640 con un suplemento de FBS al 10%. El complejo de proteína de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α y la proteína de fusión de TCR-IL2 se añadieron a una concentración de 0,8 μ g/ml y se añadió rhIL-2 a 0,2 mg/ml. Después incubarse durante la noche, las células se recogieron y se preincubaron en 0,5 mg/ml de complejo de proteína de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α o proteína de fusión de TCR-IL2 o 0,125 mg/ml de rhIL-2 en 100 μ l sobre hielo durante 30 min. Después de lavar en PBS (1 ml), las células se resuspendieron en PBS a 10×10^6 /mL para la transferencia adoptiva.

El día 1, se inyectaron i.v. a los ratones a través de la vena de la cola células tumorales A549A2 (5×10^6) para establecer tumores pulmonares. Catorce días después de la inyección de las células tumorales, los ratones se aleatorizaron y se dividieron en 5 grupos (n = 4). Los ratones se trataron con ciclofosfamida (CTX) a través de inyección intraperitoneal a una dosis de 200 mg/kg los días 14 y 21. Las células NK (1×10^6 /ratón) preincubadas con diferentes proteínas de fusión o rhIL-2 se inyectaron iv los días 16 y 22, y los ratones que recibieron PBS sirvieron como controles. Un resumen del programa de tratamiento es el siguiente:

Grupo	CTX		Células NK	
	Dosis (mg/kg)	Inyección (IP)	Dosis (x10 ⁶)	Inyección (IV)
CTX	200	Días 14, 21	0	Días 16, 22
CTX + NK/rhIL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/MART-1scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/c264scTCR-IL2	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22
CTX + NK/ complejo de proteína de fusión c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α	200	Días 14, 21	1	Días 16, 22

5 La supervivencia de los ratones portadores de tumores se controló cada día. Los ratones moribundos se sacrificaron y se contaron como muertos. Los ratones que sobrevivieron más de 100 días después de la inyección del tumor se consideraron curados.

10 Las supervivencias medias para los ratones en los grupos de tratamiento con CTX, CTX + NK/rhIL-2, CTX + NK/MART1scTCR-IL2, CTX + NK/c264scTCR-IL2 y complejos de proteínas de fusión de c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α son de 52, 67,5, 64,5, 85,5, y 80 días, respectivamente (**Figura 20**). De este modo, la transferencia adoptiva de las células NK activadas con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α dio como resultado un tiempo más largo de supervivencia media que el observado en los animales portadores de tumor tratados con quimioterapia solo o con células NK activadas por MARTscTCR-IL2 o rhIL-2 no dirigidos. Los resultados de este experimento piloto indican que la activación y el direccionamiento de las células NK de ratón con c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α pueden proporcionar una mayor actividad antitumoral.

15 Ejemplo 20 - Mejora de la unión de los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R α a células inmunitarias que portan IL-15R como se evidencia por un tiempo de residencia prolongado en la superficie celular (de referencia)

20 El tiempo de residencia en la superficie celular de los complejos de proteínas de fusión sobre las células portadoras de IL-15R puede influir en la capacidad de la proteína de fusión para elegir como diana, o unir mediante puentes células efectoras con células tumorales específicas de TCR. Para investigar esto, se compararon directamente la unión de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15, los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R α e IL-15 recombinante a células CTLL-2 que portan receptor IL-15R α β γ C y células CTLL-2 que portan receptores IL-15R β γ C, células 32D β por citometría de flujo. Después de la incubación con las diversas proteínas, las células se lavaron y se incubaron en medio a 37°C durante hasta 180 min y el nivel de las proteínas que permanecían en la superficie celular se detectó con mAb anti-IL-15 marcado con PE. Las comparaciones entre la tinción inicial a tiempo cero y tiempos posteriores permitieron la determinación del tiempo de residencia de la superficie celular para cada una de las proteínas que se unían a IL-15R. El aumento del tiempo de residencia sobre la superficie celular de las proteínas de fusión de scTCR/IL-15 o los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R α en comparación con IL-15 sería una indicación de la actividad de unión al receptor mayor y más estable.

30 Ejemplo 21 - Aumento de la vida media in vivo de las proteínas de fusión de TCR/IL15 y los complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15:TCR/IL15R α en comparación con IL-15 en ratones (de referencial)

35 Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α , IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble en la cepa de ratón transgénico para HLA-A2.1/Kb. La presencia del dominio HLA-A2.1, para la cual está restringido c264scTCR/IL-2, puede influir en la farmacocinética de esta proteína de fusión y debe proporcionar una visión "humanizada" más relevante de la farmacocinética que otras cepas de ratón. A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa cantidades equivalentes molares de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α , IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble y se recogió la sangre en varios momentos de 5 minutos a dos semanas después de la inyección. Las concentraciones en suero de las proteínas de fusión se evaluaron utilizando formatos de ELISA, descritos anteriormente. Las concentraciones de IL-15 se detectaron con un ELISA específico de IL-15 convencional.

40 Los parámetros farmacocinéticos in vivo de c264scTCR/IL-15, complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α , IL-15

recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble se determinaron utilizando un soporte lógico de ajuste de curvas (p. ej., WinNonlin). Los valores de Cmax elevados, el incremento de la vida media en suero o la disminución del aclaramiento para c264scTCR/IL-15 o complejo c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15Ra en comparación con IL-15 recombinante o complejo de IL-15:IL-15Ra soluble serían una indicación de que la generación de la fusión de TCR-IL15 o del complejo de TCR/IL15:TCR/IL-15Ra proporciona una farmacocinética más favorable que la observada con IL-15 sola.

Ejemplo 22 - Demostración *in vivo* de los efectos inmunosupresores de antagonistas de variantes de IL-15, y proteínas de fusión y complejos de proteínas de fusión de TCR/IL15 de referencia

Para determinar si los complejos de proteínas de fusión o los antagonistas de variantes de IL-15 tienen actividad inmunosupresora *in vivo*, se utilizó un modelo de artritis autoinmunitaria experimental. Se ha demostrado que la artritis autoinmunitaria se puede inducir después de la administración de colágeno de tipo II (CII) en ratones transgénicos HLA-DR4 (Rosloniec et al. 1998. J Immunol. 160:2573-8). Adicionalmente, se han caracterizado las células T específicas de CII implicadas en la patología de esta enfermedad. Los genes de TCR de estas células T se utilizaron para construir vectores de expresión y las líneas celulares anfitrionas adecuados para generar CIIscTCR/IL15 que comprendían antagonistas de variantes de IL-15 y proteínas de fusión de CIIscTCR/IL15RaSushi como se ha descrito en ejemplos anteriores. Después de la inducción de la artritis mediante administración de CII, se inyectaron intravenosamente a ratones transgénicos HLA-DR4 CIIscTCR/IL15-antagonista+complejo CIIscTCR/IL15RaSushi o un antagonista de variante de IL-15 (intervalo de dosificación - 0,1 a 2 mg/kg), o el volumen de dosis equivalente de PBS diariamente durante cuatro o más días. Durante el estudio, se evaluaron las articulaciones de la pata del ratón y se evaluaron para determinar el grado de inflamación en una escala de 0 a 4. Se espera que todos los ratones tratados PBS desarrollen artritis. La supresión de la artritis (p. ej. disminución de la incidencia o la puntuación clínica) en algunos o todos los ratones tratados con el complejo de proteína de fusión o la variante de IL-15 sería una indicación de un efecto inmunosupresor del tratamiento. Estudios de dosificación alternativos que incluyen ciclos múltiples de dosificación también pueden demostrar la eficacia inmunosupresora de la proteína de fusión o la variante de IL-15. Se podrían utilizar complejos de proteínas de fusión alternativos que comprendieran otros dominios de TCR (esto es específicos para el péptido p53) como controles no dirigidos a la enfermedad para demostrar la especificidad de la capacidad de las proteínas de fusión de TCR redireccionadas para dirigir la actividad inmunosupresora al sitio de la enfermedad.

Referencias

1. Mortier, E., A. Quemener, P. Vusio, I. Lorenzen, Y. Boublik, J. Grotzinger, A. Plet, e Y. Jacques. 2006. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. J Biol Chem 281: 1612-1619.
2. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, y L. Lefrancois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity *in vivo*. J Immunol 177: 6072-6080.
3. Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh, y J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R {alpha} . Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9166-9171.
4. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol 6: 595-601.
5. Belmont, H. J., S. Price-Schiavi, B. Liu, K F. Card, H. I. Lee, K. P. Han, J. Wen, S. Tang, X. Zhu, J. Merrill, P. A. Chavillaz, J. L. Wong, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Potent antitumor activity of a tumor-specific soluble TCR/IL-2 fusion protein. Clin Immunol 121: 29-39.
6. Card, K. F., S. A. Price-Schiavi, B. Liu, E. Thomson, E. Nieves, H. Belmont, J. Builes, J. A. Jiao, J. Hernandez, J. Weidanz, L. Sherman, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, y H. C. Wong. 2004. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains. MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother 53: 345-357.
7. Mosquera, L. A., K. F. Card, S. A. Price-Schiavi, H. J. Belmont, B. Liu, J. Builes, X. Zhu, P. A. Chavillaz, H. I. Lee, J. A. Jiao, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, R. L. Wong, y H. C. Wong. 2005. In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgG1 Fusion Protein. J Immunol 174: 4381-4388.
8. Penichet, M. L., E. T. Harvill, y S. L. Morrison. 1997. Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. Hum Antibodies 8: 106-118.
9. Zhu, X., H. J. Belmont, S. Price-Schiavi, B. Liu, H. I. Lee, M. Fernandez, R. L. Wong, J. Builes, P. R. Rhode, y H. C. Wong. 2006. Visualization of p53264-272/HLA-A*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor. J Immunol 176: 3223-3232.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION
- <120> Moléculas de fusión y variantes de IL-15
- <130> 20793EP1
- 10 <140>
- <141> 09-05-2008
- <150> 60/928,900
- <151> 11-05-2007
- 15 <160> 40
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 25 <400> 1

```

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

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

```

Thr Ser

- 30 <210> 2
- <211> 345
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 60
 attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
 aagtgccttc tcttgagtt acaagttatt tcacttgagt cgggagatgc aagtattcat 180
 gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240
 acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg 300
 cagagttttg tacatattgt ccaaatgttc atcaacactt cttga 345

<210> 3
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 3
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

15 <210> 4
 <211> 1563
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

20 <400> 4
 accaccatgg agacagacac actcctgta tgggtactgc tgetctgggt tccaggttcc 60
 accggtcagt cagtgaogca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
 cagctgagat gcaagtatcc ctactctggg acaccttatac tgttctggta tgtccagtac 180
 ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccagc ggttcaagga 240
 gtgaatggct tgcaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
 tctgtgcaact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
 cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
 ggcagcggcg gtggtggttc cggggtggcg ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
 tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
 aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctgggt atcaacaaaa taagaacaat 600
 gagttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
 gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
 tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
 gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
 ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
 aactgggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
 aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agccctcaa ggagcagccc 1020
 gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg 1080
 cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
 gagtggacc caggatagggc caaacccgct acccagatcg tcagcgccga ggctgggggt 1200
 agagcagacg ttaacaactg ggtgaatgta ataagtgatt tgaaaaaat tgaagatctt 1260
 attcaatcta tgcattattga tgctacttta tatacggaaa gtgatgttca cccagttgc 1320
 aaagtaacag caatgaagtg ctttctcttg gagttacaag ttatttcaet tgagtcogga 1380
 gatgcaagta ttcattgatac agtagaaaa atctggatgc ctgatcatcc tagcaacaa cagtttgtct 1440
 tctaattggga atgtaacaga atctggatgc aaagaatgtg aggaactgga ggaaaaaat 1500
 attaaagaat ttttgacagag ttttgtacat attgtcctaaa tgttcatcaa cacttcttga 1560
 taa 1563

25 <210> 5
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 470 772 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 5

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1           5           10           15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
          20           25           30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
          35           40           45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
          50           55           60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65           70           75           80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
          85           90           95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
          100          105          110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
          115          120          125

Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130           135          140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145           150          155          160

Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
          165          170          175

Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180           185          190

Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195           200          205

Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210           215          220

Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225           230          235          240

Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
          245          250          255

Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
          260          265          270

Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275           280          285

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290           295          300

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 305           310          315          320

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
          325          330          335

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
          340          345          350

```

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400

Asp Val Asn Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
 405 410 415

Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
 420 425 430

Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
 435 440 445

Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp
 450 455 460

Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn
 465 470 475 480

Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu
 485 490 495

Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met
 500 505 510

Phe Ile Asn Thr Ser
 515

<210> 6
 <211> 1614
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

10 <400> 6
 accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
 accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
 cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttate tgttctggta tgtccagtac 180
 ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
 gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
 tctgtgcaact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
 cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgggt 420
 ggcagcggcg gtggtgggtc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
 tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
 aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctgggt atcaacaaaa taagaacaat 600
 gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
 gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
 tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
 gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caagggtgtc 840
 ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
 aactgggtgt gcctggccac aggtttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
 aatgggaagg aggtgcacag tggggctcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
 gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg 1080
 cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaaatgac 1140
 gagtggacce aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcggcga ggcctggggt 1200

agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260
 acgcgtaact gggatgaatgt aataagtgat ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320
 atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380
 gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt 1440
 attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaca acagtttgtc ttctaattggg 1500
 aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1560
 tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acatttcttg ataa 1614

<210> 7

5 <211> 534

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 7

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

				245					250							255
Gly	Thr	Glu	Val	Phe	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu	
			260					265					270			
Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	
		275					280					285				
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	
	290					295					300					
Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	
				325					330					335		
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	
			340					345						350		
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	
		355					360					365				
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	
	370					375					380					
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	
385					390					395					400	
Asp	Val	Asn	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	
				405					410					415		
Ser	Pro	Thr	Arg	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	
			420					425					430			
Glu	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	
		435					440					445				
Ser	Asp	Val	His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	
	450					455					460					
Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	
465					470					475					480	
Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	
				485					490					495		
Asn	Gly	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	
			500					505					510			
Glu	Lys	Asn	Ile	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	
		515					520					525				
Met	Phe	Ile	Asn	Thr	Ser											
	530															

<210> 8
 <211> 1647
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 8

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttatac tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt ggttcaagga 240
gtgaatggct tgcaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcggg 420
ggcagcggcg gtggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480
tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
ccacccgagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
acactggtgt gcctggccac aggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgcga ggctgggggt 1200
agagcagacg ttaacatcac gtgccctccc ccatgtccg tgaacacgc agacatctgg 1260
gtcaagagct acagcttgta ctccagggag cggtacattt gtaactctgg tttcaagcgt 1320
aaagccggca cgtccagcct gacggagtgc gtgttgaaca aggccacgaa tgtcgcccac 1380
tggacaaccc ccagtctcaa atgcattaga cccgcagett catctcccag ctcaaacaac 1440
acagcggcca caacagcagc tattgtcccg ggctcccagc tgatgccttc aaaatcacct 1500
tccacaggaa ccacagagat aagcagtcac gagtcctccc acggcacccc ctctcagaca 1560
acagccaaga actgggaact cacagcatcc gcctcccacc agccgcccagg tgtgtatcca 1620
5 cagggccaca gcgacaccac ttgataa 1647

```

<210> 9

<211> 545

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

15 <400> 9

ES 2 470 772 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20 25 30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35 40 45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85 90 95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 100 105 110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145 150 155 160

Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 165 170 175

Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180 185 190

Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195 200 205

Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210 215 220

Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225 230 235 240

Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 260 265 270

Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275 280 285

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290 295 300

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 325 330 335

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 340 345 350

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400

Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp
 405 410 415

Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys
 420 425 430

Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys
 435 440 445

Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu
 450 455 460

Lys Cys Ile Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400

Asp Val Asn Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp
 405 410 415

Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys
 420 425 430

Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys
 435 440 445

Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu
 450 455 460

Lys Cys Ile Arg
 465

<210> 12

<211> 1467

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 12

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttatc tgttctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggctgcagct gtcctcaag tactattcag gagaccagc ggttcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
tctgtgcaact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcgg 420
ggcagcggcg gtgggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcggttc ctcgagcaat 480
tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
ccaccggagg tcgctgtggt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 900
acactgggtg gcctggccac aggcttcttc cctgaccagc tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgcg agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctcggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggaacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggccctgggg 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260
acgcgtatca cgtgccctcc ccccatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc 1320
tacagcttgt actccagggg gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 1380
acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc 1440
cccagttctca aatgcattag atgataa 1467
    
```

<210> 13
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 13

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1                               10                          15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20                               25                          30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35                               40                          45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50                               55                          60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65                               70                          75                          80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85                               90                          95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 100                              105                          110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115                              120                          125

Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130                              135                          140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145                              150                          155                          160

Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 165                              170                          175

Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180                              185                          190

Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195                              200                          205

Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210                              215                          220

Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225                              230                          235                          240

Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
 245                              250                          255

Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 260                              265                          270

Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275                              280                          285

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290                              295                          300

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
    
```

10

ES 2 470 772 T3

305					310					315					320
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
				325					330					335	
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
			340					345					350		
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
		355					360					365			
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
	370					375					380				
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
385					390					395					400
Asp	Val	Asn	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro
				405					410					415	
Ser	Pro	Thr	Arg	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala
			420					425					430		
Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile
		435					440					445			
Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu
	450					455					460				
Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser
465					470					475					480
Leu	Lys	Cys	Ile	Arg											
				485											

<210> 14
 <211> 1614
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

10 <400> 14

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgctctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt gggtcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcggg 420
ggcagcggcg gtggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
ccacccgagg tgcgtgtggt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc 900
acactgggtg gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga ggtctcggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggacce aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggg 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260
acgcgtaact ggggtaatgt aataagtgtc ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320
atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt 1440
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttgtc ttctaattggg 1500
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1560
tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg ataa 1614

```

<210> 15

5 <211> 1614

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 15

```

accaccatgg agacagacac actcctgtta tgggtactgc tgctctgggt tccaggttcc 60
accggtcagt cagtgacgca gcccgatgct cgcgtcactg tctctgaagg agcctctctg 120
cagctgagat gcaagtattc ctactctggg acaccttacc tgctctggta tgtccagtac 180
ccgcggcagg ggctgcagct gctcctcaag tactattcag gagaccaggt gggtcaagga 240
gtgaatggct tcgaggctga gttcagcaag agtaactctt ccttccacct gcggaaagcc 300
tctgtgcact ggagcgactc tgctgtgtac ttctgtgttt tgagcgagga tagcaactat 360
cagttgatct ggggctctgg gaccaagcta attataaagc cagacactag tgggtggcggg 420
ggcagcggcg gtggtggttc cgggtggcggc ggttctggcg gtggcgggtc ctcgagcaat 480
tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 540
aggtgtatcc ctgaaaaggg acatccagtt gtattctggg atcaacaaaa taagaacaat 600
gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 660
gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagttc 720
tctgaggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gtctgtcagg gggcggcaca 780
gaagttttct ttggtaaagg aaccagactc acagttgtag aggacctgaa caaggtgttc 840
ccacccgagg tgcgtgtggt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc 900
acactgggtg gcctggccac aggtctcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 960
aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acggaccgc agcccctcaa ggagcagccc 1020
gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga ggtctcggc caccttctgg 1080
cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 1140
gagtggacce aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggg 1200
agagcagacg ttaacgagcc caaatcttct gacaaaactc acacatctcc accgtctcca 1260
acgcgtaact ggggtaatgt aataagtgtc ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 1320
atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgatgttc accccagttg caaagtaaca 1380
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt 1440
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaaaa acagtttgtc ttctaattggg 1500
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1560
tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttcttg ataa 1614

```

<210> 16
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
20 25 30

10

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35 40 45
 Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50 55 60
 Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65 70 75 80
 Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85 90 95
 Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 100 105 110
 Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145 150 155 160
 Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 165 170 175
 Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180 185 190
 Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195 200 205
 Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210 215 220
 Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225 230 235 240
 Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 260 265 270
 Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275 280 285
 Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290 295 300
 Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 325 330 335
 Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 340 345 350
 Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365
 Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400

Asp Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
 405 410 415

Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Ala Leu Lys Lys Ile
 420 425 430

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
 435 440 445

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
 450 455 460

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
 465 470 475 480

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
 485 490 495

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
 500 505 510

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
 515 520 525

Met Phe Ile Asn Thr Ser
 530

<210> 17
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción sintética

<400> 17
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ala Arg Val Thr Val
 20 25 30

Ser Glu Gly Ala Ser Leu Gln Leu Arg Cys Lys Tyr Ser Tyr Ser Gly
 35 40 45

Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Arg Gln Gly Leu Gln
 50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Tyr Ser Gly Asp Pro Val Val Gln Gly Val Asn
 65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ser Lys Ser Asn Ser Ser Phe His Leu Arg
 85 90 95

Lys Ala Ser Val His Trp Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Val Leu
 100 105 110

Ser Glu Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Ile Ile Lys Pro Asp Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Lys
 145 150 155 160

Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys Gly Gln Gly Gln Lys Ala
 165 170 175

Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His Pro Val Val Phe Trp Tyr
 180 185 190

Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe Leu Ile Asn Phe Gln Asn
 195 200 205

Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr Glu Lys Arg Phe Ser Ala
 210 215 220

Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu Glu Ile Gln Ser Ser Glu
 225 230 235 240

Ala Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Ser Gly Gly
 245 250 255

Gly Thr Glu Val Phe Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu
 260 265 270

Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
 275 280 285

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
 290 295 300

Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
 325 330 335

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
 340 345 350

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
 355 360 365

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
 370 375 380

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
 385 390 395 400

Asp Val Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
 405 410 415

Ser Pro Thr Arg Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asn Leu Lys Lys Ile
 420 425 430

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
 435 440 445

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
 450 455 460

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His

<210> 23
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 10 <400> 23
 tggtagggtta acgagcccaa atcttctg 28

 <210> 24
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 20
 <400> 24
 attattacgc gttggagacg gtggagatg 29

 <210> 25
 <211> 32
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 25
 tgagtgatcg ataccacat ggagacagac ac 32

 35 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 26
 45 tggtaggacgc gtaactgggt gaatg 25

 <210> 27
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 27
 55 tggtaggtcta gaattatcaa gaagtgtga tg 32

 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 65 <400> 28
 agtccagcgg tgcctgtgg 20

<210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 10 <400> 29
 tgacgcggtt aagtggtgtc gctgtgccct g 31

 <210> 30
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 20
 <400> 30
 tggtaacat cacgtgccct cccccatg 29

 <210> 31
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 31
 ttgtgacgc gtttatctaa tgcattgag actgg 35

 35 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 32
 45 taataaacgc gtatcacgtg ccctc 25

 <210> 33
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 33
 55 tgggtgtcta gattatcatc taatgcattt g 31

 <210> 34
 <211> 32
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 65 <400> 34
 tgagtgccg gaaccacat ggagacagac ac 32

<210> 35
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 10 <400> 35
 ttgtggcgg ccgcttatca tctaatgcat ttgag 35

 <210> 36
 <211> 34
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético
 20
 <400> 36
 tgagtgtcg aattatcaag aagtgtgat gaac 34

 <210> 37
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 37
 ttgtggcgg ccgcttatca agtgggtcg ctg 33

 35 <210> 38
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 38
 45 agatctcaa ttttttcaa mkhactatt acattcacc ag 42

 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 <400> 39
 55 actgggtgaa tgtaataagt dmlctgaaaa aaattgaaga tc 42

 <210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

 65 <400> 40
 tgggtgtcta gattatcaag aagtgtgat g 31

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante interleuquina 15 humana (hIL-15) aislada que comprende una sustitución de aminoácido de N a D en la posición 72 de una secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1), en donde la variante de hIL-15 funciona como un agonista IL- 15 y tiene un incremento de la actividad de unión para los receptores de cadena beta/gamma del receptor de interleuquina 15 (IL-15R $\beta\gamma$ C) en comparación con el polipéptido de IL-15 nativo.
- 10 2. Una variante interleuquina humana 15 (hIL-15) aislada que comprende una sustitución de aminoácido de N a R en la posición 72 de una secuencia de IL-15 humana madura (SEQ ID NO: 1), en donde la variante de hIL-15 funciona como un antagonista de IL-15 y tiene una disminución de la actividad de unión para los receptores IL-15R $\beta\gamma$ C en comparación con el polipéptido nativo de la IL-15.
3. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de IL-15 de la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector de ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 4.
6. Un método para producir la variante de IL-15 de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el método:
- 15 cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 5 en condiciones suficientes para expresar la variante de IL-15;
- 15 producir de este modo la variante de IL-15.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente la purificación de la variante de IL-15.
- 20 8. Una cantidad eficaz de la variante de IL-15 de la reivindicación 1 para su uso en un método de estimulación de respuestas inmunitarias en un mamífero.
9. Una cantidad eficaz de la variante de IL-15 de la reivindicación 2 para su uso en un método para suprimir las respuestas inmunitarias en un mamífero.

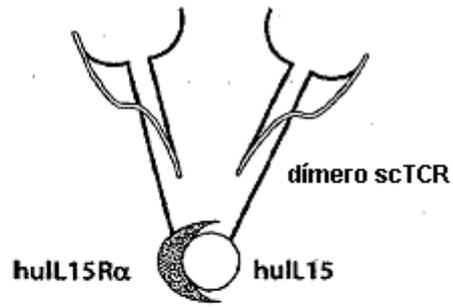


Fig. 1A

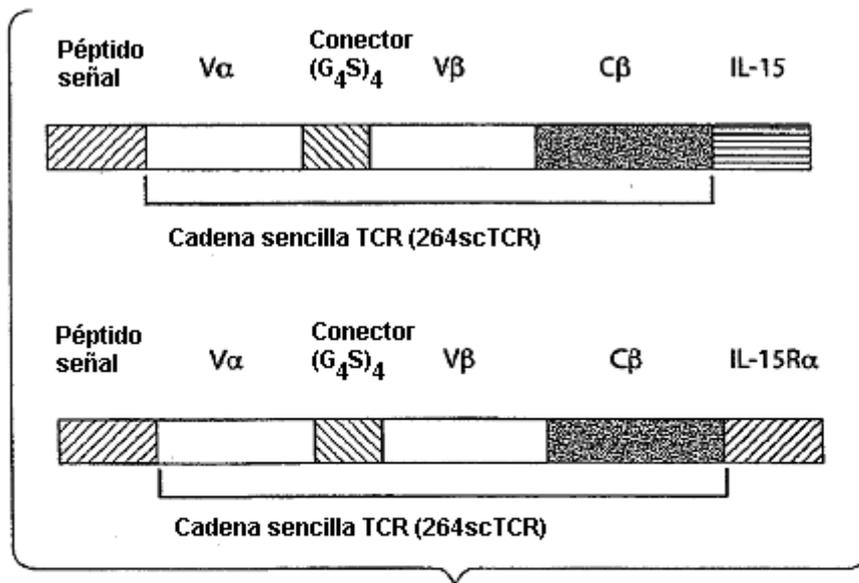


Fig. 1B

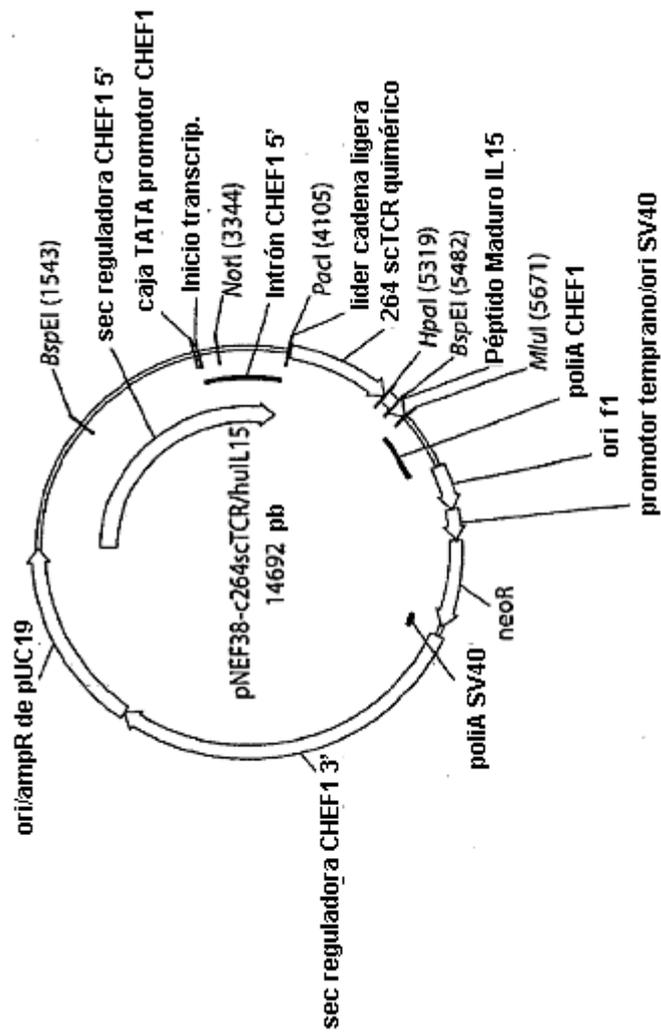


Fig. 2A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTATTATGGGTACTGCTGCTCIGGGFTCCAGGTTCCACCGGTCAGT
 CAGTGCAGCCCGATGCTCGGTACTGTCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTC
 CTACTTGGGRCACCTTATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACC CGGGCCAGGGCTGCAGCTGCTCTCTCAAG
 TACTATTCAGGAGACCCTGCTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTT
 CCTTCCACCTGGGGANAGCCCTGTGTGCACATGGAGCCGACTCTGTCTGTGTACTCTGTGTGTCGCGAGGA
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTTATAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGCGGTGGTGGTTCGGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGGGGTTCTCGAGCAATTCAAAAGTCA
 TTCRAGCTCCAAAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAAGCAAAAGATAGGTTGATTCCTCGAAAAGGG
 ACATCCAGTTGATTTCTGGTATCAACABAATAAGAACARTGAGTTTAAATTTTGGATTAACCTTTCAGAAAT
 CAAGAGTTCTTCAGCRAATAGACATGACTGAAANAACGATTTCTGTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 GCAGCCTAGAAATTCAGTCCCTGTGAGGCGAGGACTCAGCCTGTACTCCCTGTGCCAGCAGTCTGTTCAGG
 GGGCGGCACAGAAGTTTCTTTGGTAAAGGAACCCAGACTCACAGTTGTGAGGACCTGAACAAAGGTGTTT
 CCACCCGAGTCTGTGTTTGGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCCCTGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAG
 TGGGGTCAACACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGC
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCYGGCAGAACCCCGCCAAACCCCTCACCCAGATCGTCAGCCGCGGA
 ACGGCTCTGGAGATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCCTGATGATTTGAAAATAAATTTGAGATCTT
 GGCTGGGTAGCAGACGCTTAACTGGGTGAATGTAATAGTGTGATTTGAAAATAAATTTGAGATCTT
 ATTCATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGTGTTCCACCCAGTTGCRAAGTAAACAG
 CAATGAAAGTCTTCTCTGGAGTTACAGTTATTTCACTTGGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATAC
 AGTAGAAATCTGATCATCTAGCAACACAGTTTGTCTTCTAAAGGAAATGTAACAGAAATCTGGATGC
 AAAGAAATGTGAGGAACTGGAGGAAAATAATTAAGAAATTTTTTGCAGAGTTTGTACATATTTGTCCAAA
 TGTTCATCAACACTTCTTTGATNA -3'

Fig. 2B

```

metdtlllwllwvpgstgsvtqpdarvtvsegasqlrcckysysgtpylfwygyprqglqlllkyyS
< Péptido señal >< TCR Vα
gdpvvgvngfeafeksnssfhlrkasvhwdsavfclvsedsnyqlwgsqtkllkpdtsgggsgg
TCR Vα >< CONECTOR
ggsgggsgggssnskvigtprylvkgggqkakraclpekghpvvfwyqgnknefkflnfgnqevlq
CONECTOR >< TCR Vβ
qidmtekrfaecpnsnpscslleiqsseagdsalylcasslsgggtevfkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
fepseaeishtqkatlvolatgfpdhvelswvwngkevhsgvstpplkeqpalndsryclsrlrvsa
TCR Cβ
tfwqprnhfrcgyqfyqlsendewtqdrakpvtqivsaeawgradvnnwvnsldkkiodliqsmhida
TCR Cβ > < IL-15
tlytesdvhpsockvtamkcflllelqlvislesgdasihdtvenliilannslsngnvtsgckeceleek
IL-15

nikeflqsfvhiwqmfints
IL-15 >

```

Fig. 2C

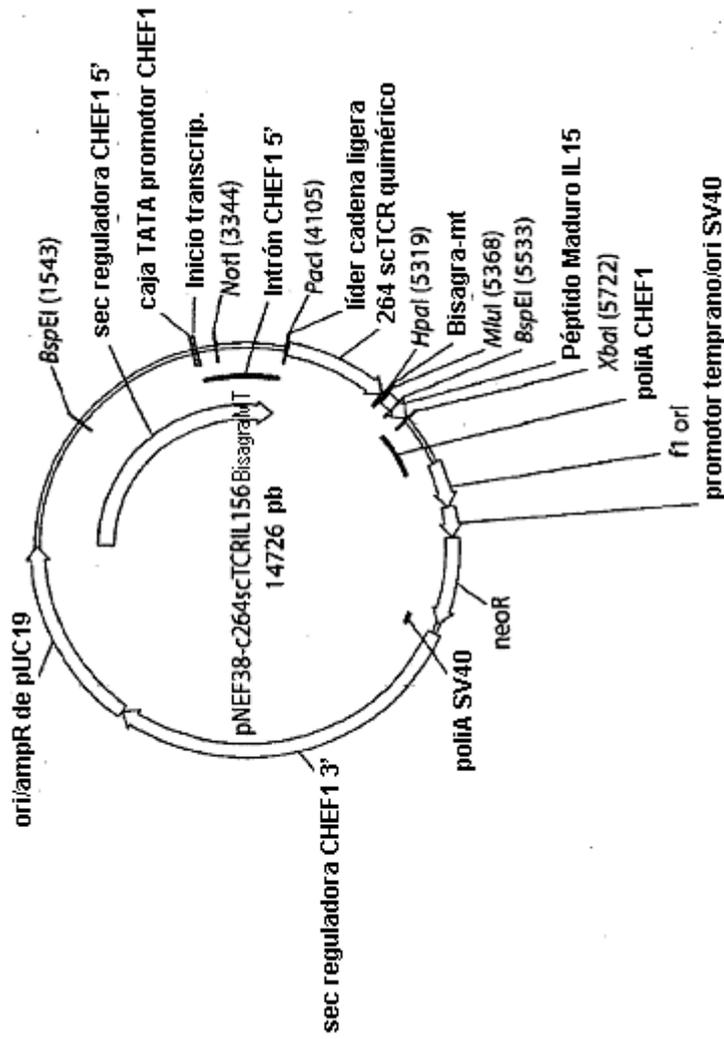


Fig. 3A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCAGGTCAGTCAGTGACCGCAGC
 CCGATGCTCGCGTCACTGTCCTCTGAAGGAGCCCTCTGCACTGAGATGCAAGTATTCCCTACTCTGGGACACCTTATCTGTGT
 CTGGTATGTCAGTACCCCGCGCAGGGGCTGCACTGCTCCTCAAGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAAT
 GGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCCTCCACTGCGGAAAGCCCTCTGTGCACCTGGAGCGACTCTGCTGTGT
 ACTTCTGTGTTTTGAGCCGAGGATAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATATATARAAGCCAGACACTAG
 TGGTGGCGTGGCAGCGCGGTTGGTGGTTCGGTGGCGGGTCTGGCGGTTCCCTCGAGCAATTCAAAAGTCATT
 CAGACTCCAAGATATCTGGTGAAGGGCRAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGARAAGGGACATCCAGTTGTAT
 TCTGGTATCAACAAAATAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGAATTAATTTTCAGAAATCAAGAAATTTCTTTCAGCMAATGACAT
 GACTGMAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTCTTCAAACCTCACCTTGCAGCCCTGAAATTCAGTCTCTGAGGCCAGGAGACTCA
 GCACCTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTTCAGGGGGCGGCACAGARTTTTTCTTTGGTAAAGAAACCAAGACTCAGATTGTGTAG
 AGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCAC
 ACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCCAGTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACACAGTGGG
 GTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCCTGAGCAGCCCGCTGAGGGTCT
 CGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGCAACCCAGTCCAGTCCAGTCTCAGGGCTCTCGGAGATGACCGAGTGGAC
 CCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGTCCAGT
 GACAAAATCAGACTCTCCACCGTCTCCACCGGTAACTGGGTGAATGTATAGTGTATGAAAANAATTTGAAGATCTTA
 TTCAAATCATGCAATATGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGAATGTTCCACCCAGTTCGAAAGTAAACAGCAATGAAGTCTT
 TCTCTTGGAGTTACAAAGTTATTTCACTTGAATCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTGAAGAAATCTGATCATCTCCTAGCA
 AACACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAACTCTGATGCAAAAGTGTGAGGAACTGGAGGAAARAAATATTAAG
 AATTTTTGCAGAGTTTTTGTACATATTTGCCAAATGTTGATCAACACTTCTTGATAA - 3'

Fig. 3B

```

metdtlllwwpvgstgsvtqpdarvtvsegaslqrcckysygtpylfwyvqprgglqlllkyyys
< Peptido señal >< TCR Vα
-----
gdpvvgvngfeaeifsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqliwsgtkllikpdtsgggsgg
TCR Vα >< CONECTOR
-----
ggsgggsgggsgssnskviqtprylvkgggkkmrcipekghpvvfwyqgnknefkflinfqngelvq
CONECTOR >< TCR Vβ
-----
qidmtekrfsaepcspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgrltvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
-----
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstppkqpalndsrycissrlrvsa
TCR Cβ
-----
t.fwqprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpytqivseawgradvnepkssdkthtsppsptrnwvni
TCR Cβ > < CONECTOR > <IL-15
-----
sdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpsckvtamkcflllelqvvislesgdaslhdvtenliilannslsn
IL-15
-----
gnvtesgckeceeeleeknikeflqsfvhivqmifnts
IL-15 >

```

Fig. 3C

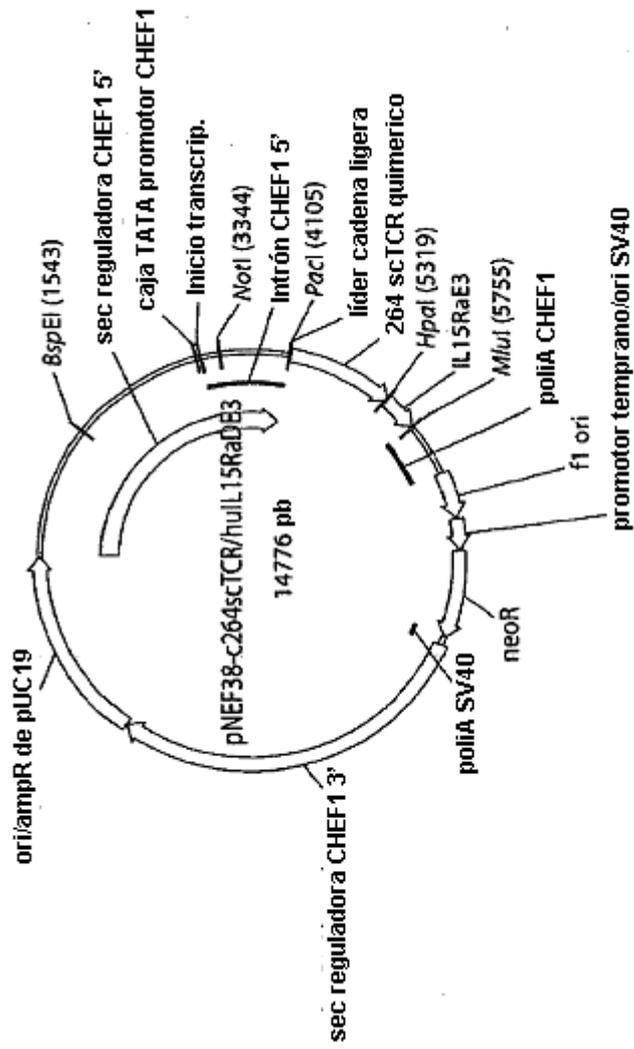


Fig. 4A


```

metdtlllwllwvpsstgqsvtqpdarvtvsegasqlrckysysgtpylfwyvyprqglqllkyys
< Péptido señal >< TCR Va
gdpvvgvngfeaeftsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlseedsnyqlwsgtklilkpdtsgggsgg
TCR Va >< Conector
ggsgggsgggssnskviqtprylvkgggqkkmrcipekghpvvfwyqgnknefkflinfqnevlg
Conector >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqssegdsalylcaaslgggtevfqgktrltvvedlnkvfppevay
TCR Vβ >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlvclatgfpdhvelswvngkevhsqvstppqlkegpaindsryclssrlrvsa
TCR Cβ
tfwqprnhfrcqvgyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradvnitoppmsvehadiwvksyslys
TCR Cβ > < IL-15RADE3
reryicnsgfkrkqgtssltecvlnkatnvahwtptslkciirpaasspsnntaataaivpqsqmpsk
IL-15RADE3
pstgteissheshgtpsgttaknweiltasahqppgyvppgghsdt
IL-15RADE3 >

```

Fig. 4C

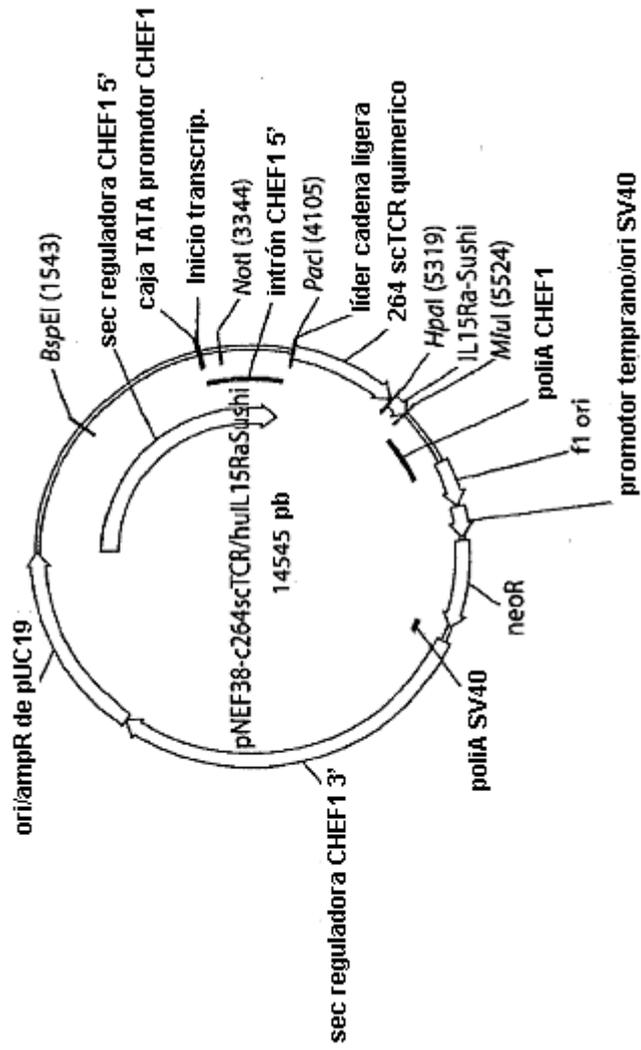


Fig. 5A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACATCCCTGTTAAGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACCGGTGAGT
 CAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCTCACTGTCTCTGARGGAGCCCTCTGACAGTGCAGTGCAGTGCAGATGCAAGTATTC
 CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCAGTACCCCGGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAG
 TACTATCAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGTTCAGCAAGATAACTCTT
 CCTCCACCTCCGGAAAGCCCTCTGCTGCTGACTGGAGCCGACTCTGCTCTGACTTCTGTGTTTGGCGGAGGA
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATATAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGGCGGTGGTGGTCCGGTGGGGCTCTGGGGTGGGCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG
 TTCAGACTCCAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGG
 ACATCCAGTTCTTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 CAGGAGTTCTTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 GCAGCTAGAAATTCAGTCCCTCTGAGGCAAGGACTCAGCACTGTACTCCTGTGCCAGCNGTCTGTGTCAGG
 GGGCGCACAGAGTTTCTTGGTAAAGGAACCAAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAAGGTGTTC
 CCACCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGT
 GCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAAGGAGGTGCACAG
 TGGGTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGTACTGCCCTGAGC
 AGCCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGCAACCACTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCT
 ACGGCTCTCGGAGANTGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTACGGCCGA
 GGCTGGGGTAGACAGACGTTAACATCACTGCTCCCTCCCTCCCTGTCGGTGAACACCCAGACATCTGG
 GTCAAAGACTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCCGCA
 CGTCCAGCCTGACGGAGTGGGTGTAACAAGGCCACGAAATGTCCGCCACTGGACAAACCCCCAGTCTCRA
 ATGCATTAGA-3'

Fig. 5B

```

metdt111wv111wvpgstgqsvtqpdarvtvsqgslqlrckysysgtpylfwygyprgglql11kyyys
< Péptido señal >< TCR Va
-----
gdpvvgvngfeaeafksnssfhlrkesvhwdsavvfcvlseidnyqlimgsgtkliikpdtsgggsgg
TCR Va >< conector
-----
ggsgggsgggssnsvkviqtprylvkgggqkkmrcipokghpvvfwyqknnefkflinfqngv1q
conector >< TCR Vb
-----
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalyicasslsgggtevfkgtrltvvedlnkvfppevav
TCR Vb >< TCR Cb
-----
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstpplkeqpaldsryclssrlrvsa
TCR Cb
-----
tfwqnrnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaawgradvnitcpppmsvehadiwvksyslys
TCR Cb >< IL-15RaSushi
-----
Reryicnsgfkrkkgtssttecvlnkatnvahwttppalkcir
IL-15RaSushi >

```

Fig. 5C

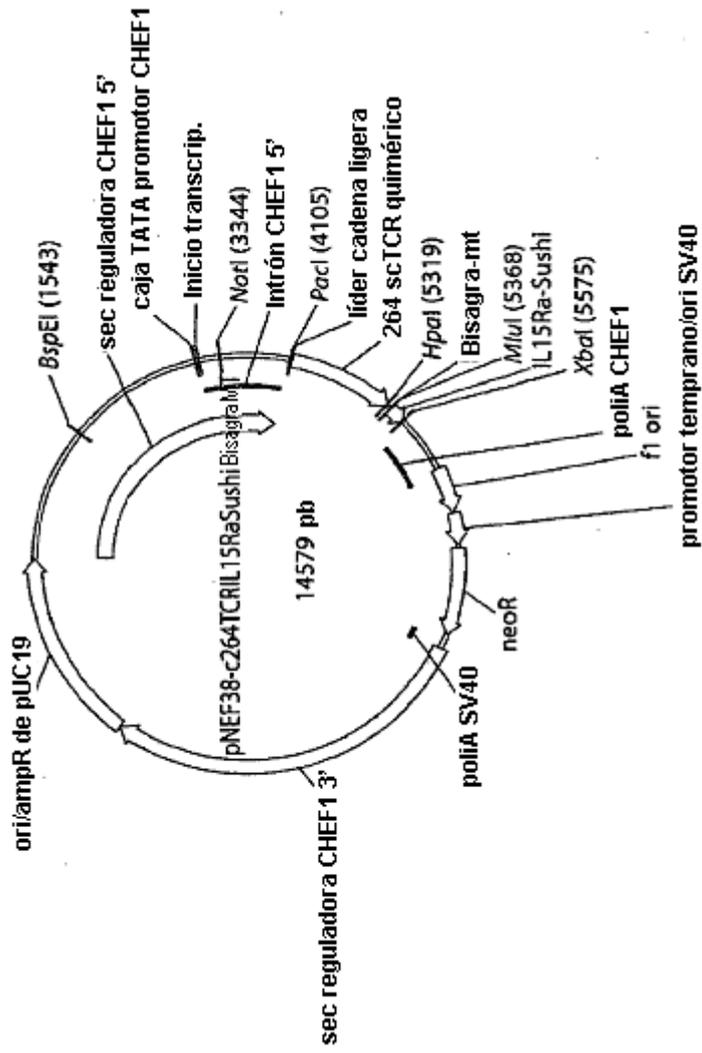


Fig. 6A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTATTATGGGTACTGTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGTCAGT
 CAGTGA CGCAGCCCGATGCTCGGTCACCTGTCTCTGAAGGAGCCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTC
 CTACTCTGGGACACCCTTACTGTCTCTGGTATGTCCAGTACCCCGCGGACGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAG
 TACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGAGFTTCAGCAAGAGTAACTCTT
 CCTTCCACCTGGCGAAGCCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGGAGGA
 TAGCAACTATCAGTTGATCTGGGCTCTGGACCAAGCTAATATAAAGCCAGACACTAGTGGTGGCGGT
 GGCAGCGCGGTGGTGGTCCCGTGGCGGCGGTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCTCGAGCAATTC
 AACAAAGTCA
 TTCAGACTCCARGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAGCAAAAGCAAAAGATGAGGTGATCCCTGAAAAGGG
 ACATCCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAATAAGAACAAATGATGATTAATGATTTTGGATTAACTTTCAGAA
 CAAAGATTCTTCAGCAATFAGACATGACTGAAAACCGATTTCTCTGTGCTGAGTGTCTTCAAACTCACCTT
 GCAGCCTAGAATTCAGTCTCTGAGGCAGGAGACTCAGCACTGTACCCTCTGTGCCAGCCAGTCTGTCCAGG
 GGCAGCACAGAGTTTTCTTTGGTAAAGAACCCAGACTCAGACTGTGTAGAGGACCTGAAACAAGGTGTTTC
 CCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACACCCAAAGGCCACACTGGTGT
 GCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAAGGAGGTGCACAG
 TGGGTCAGCACGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATCTGCTGAGC
 AGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGCAAGTCCAGTTCT
 ACGGCTCTCGGAGMATGACGAGTGGACCCAGGNTAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGGCGCGA
 GCGCTGGGGTAGAGCAGCGTTAACGAGCCCAATCTTCTGACAAACTCACACTCTCCACCGTCTCCA
 ACGGATACAGTGGCTCCCGCATGTCCGTGGAACACGGACACTCTGGTCAAGAGCTACAGCTTGT
 ACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCAGCCCTGACGGAGTG
 CGTGTGAAACAAGGCCACGAAATGTGCCCCACTGGACAAACCCCGACTCAAAATGCCATTAGATGATAA -3'

Fig. 6B

```

metdtlllwvllwvpgstgqsvtqpdarvtvsegaslqrcrkyysgtpylfwyqprgglqllkyyys
< Péptido señal > TCR Va
gdpvvqgvngfeafsksnssfhlrkasvhwdsaaayfcvlsedsnyqliwsgtkliikpdtsgggsgg
TCR Va >< Conector
ggsgggsgggssnskviqtprylvkqggkakmrncipekghpvvfwyqqknnefkflinfqngevlq
Conector >< TCR Vb
qidmtekrfsaecpanspcslsleiqsseagdsalylcasslsgggevffgkgrlrvvedlnkvfppevay
TCR Vb >< TCR Cb
fepseaeishtqkatlyclatgfpdhvelswvngkevhsgvstppkqpalndsryclssrlrvsa
TCR Cb
tfwqprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqlysaawgradvnepkasdkthtsppsptritcPPP
TCR Cb > < Conector > <
msvehadiwksyslysreryicnsgfkrkagtsltecvlnkatnvahwttpsllkclir
IL-15RaSushi >

```

Fig. 6C

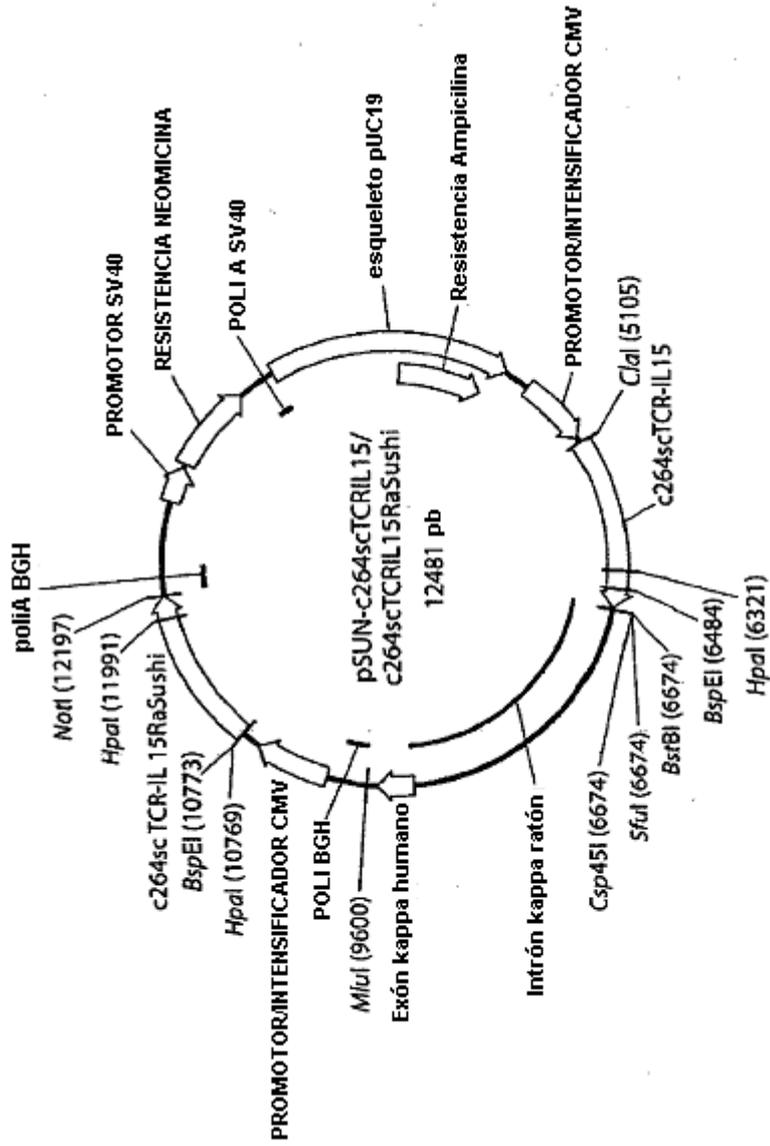


Fig. 7

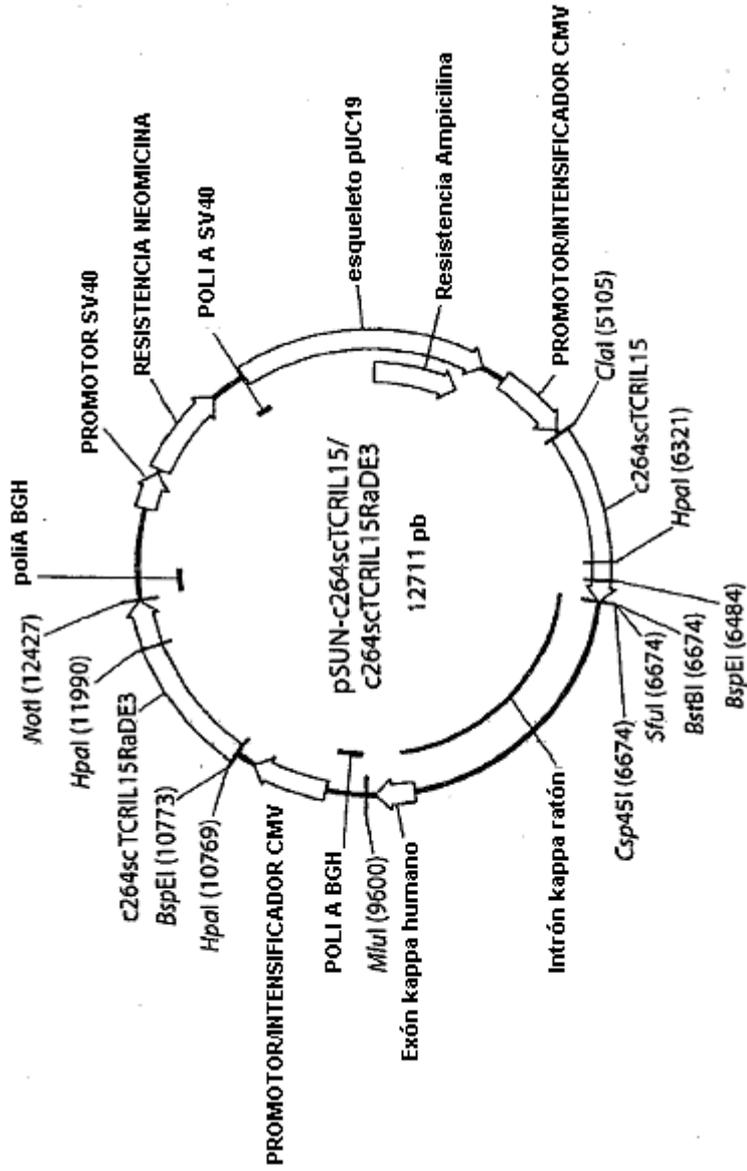


Fig. 8

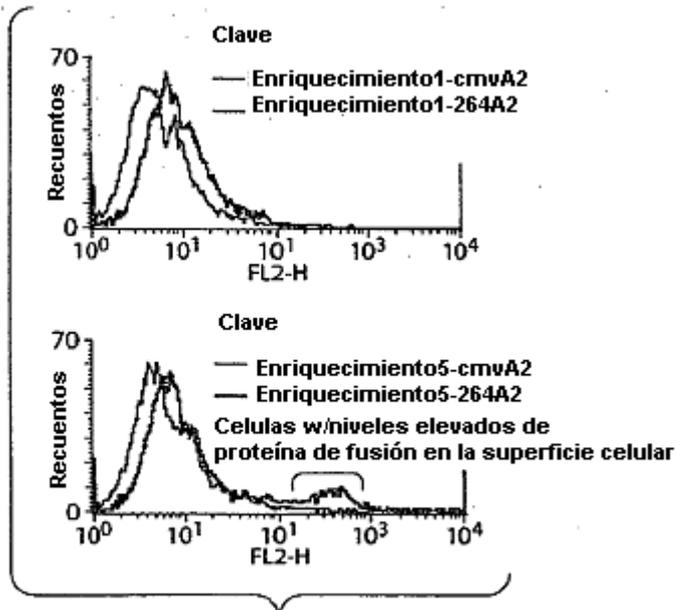


Fig. 9A

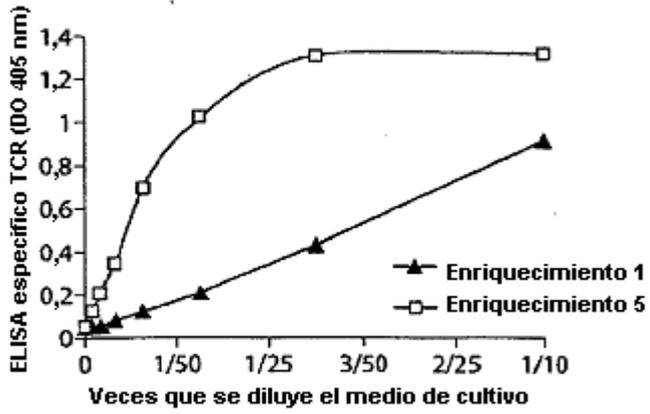


Fig. 9B

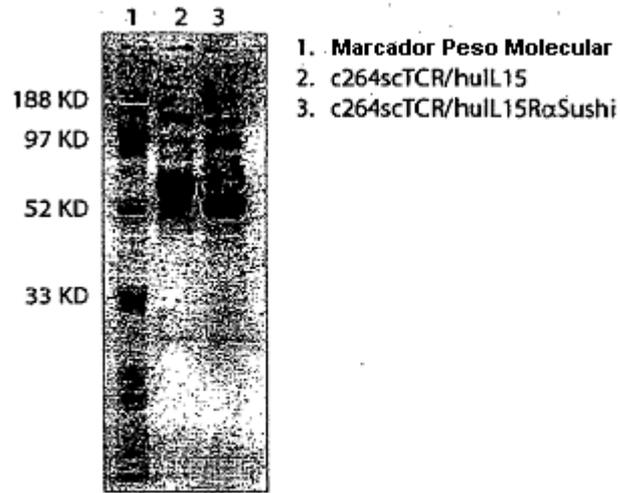


Fig. 10A

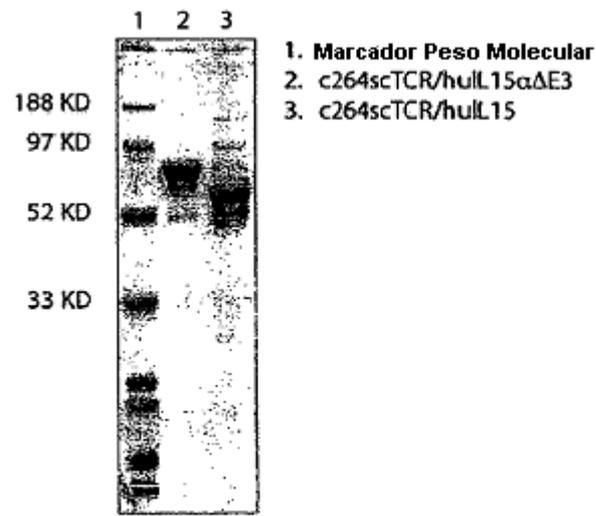


Fig. 10B

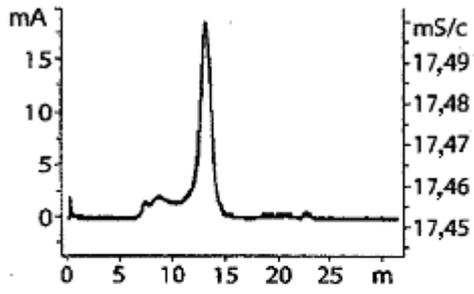


Fig. 11A

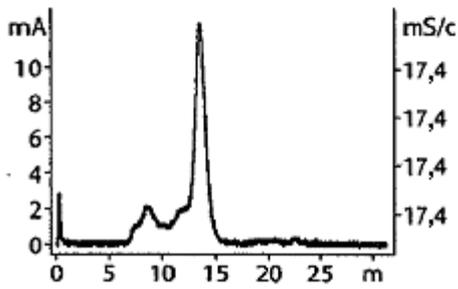


Fig. 11B

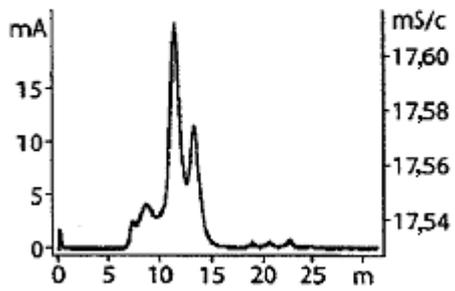


Fig. 11C

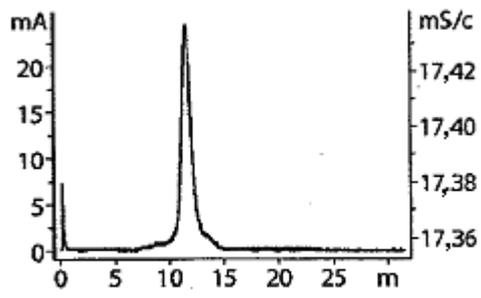


Fig. 12A

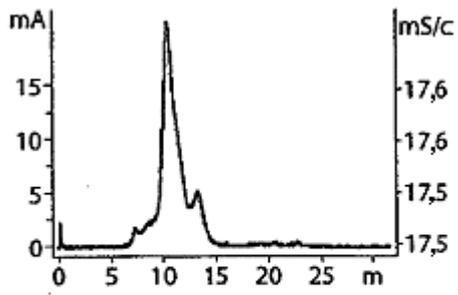


Fig. 12B

Clave

- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15
- T2 cargada péptido p53 teñida w/ c264scTCR/IL15
- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15 + c264scTCR/IL15R α Sushi
- T2 cargada péptido p53 teñida w/ c264scTCR/IL15 + c264scTCR/IL15R α Sushi
- T2 control (sin péptido) teñida w/ c264scTCR/IL15R α Sushi
- T2 cargada péptido p54 teñida w/ 264TCR/IL15R α Sushi

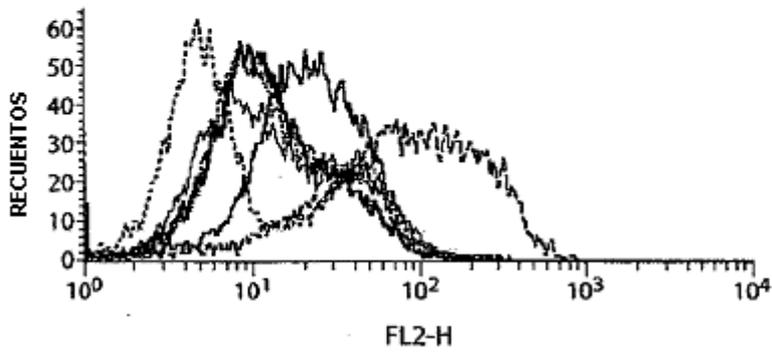


Fig. 13

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASI
 HDTVENLIILANNLSLSSNGNVTESGCKECEBLEEKNIKEFLQSPVHIVQMFINTS

Fig. 14A

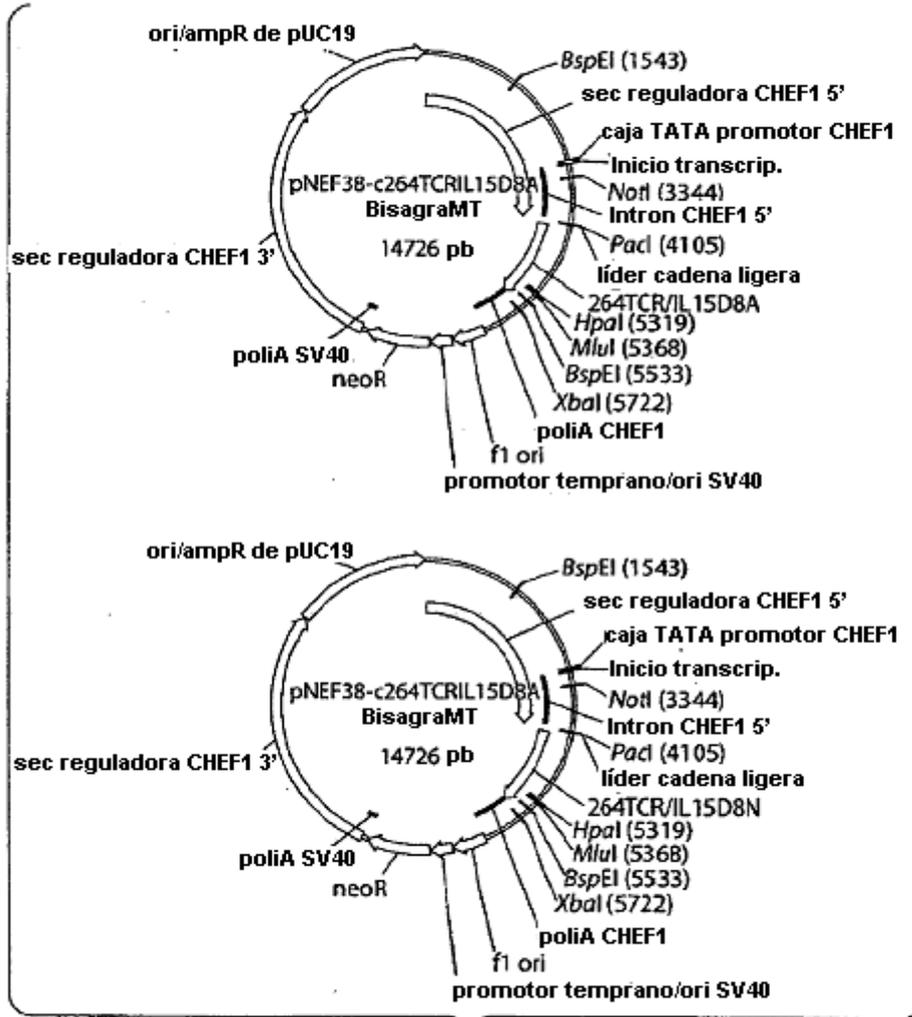


Fig. 14B

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8A

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTTC
 CAGGTTCCACCGGTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC
 TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
 TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
 AGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA
 GTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
 AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
 TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACAC TAGTGGTGG
 CCGTGGCAGCGGGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGGGCGTTCTGGCGGTGGCGGT
 TCTCGAGCAATTCAAAAGTCATT CAGACTCCAAGATATCTGGTGAAGCGGC
 AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
 ATCTGTTATCAACAAAATAAGAAACAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACCTT
 CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAATAGACATGACTGAAAAACGATPCTCTG
 CTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTTGAGCCTAGAAAATTCAGTCTCTCTGAGGC
 AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGT CAGGGGGCGGCACA
 GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA
 AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTC
 CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA
 GCACGGACCCCGCAGCCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA
 CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGC
 AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
 GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCAACCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG
 GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT
 CCACCGTCTCCAACGCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTGCTTTGAAAAAAA
 TTGAAGATCTTATTC AATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG
 TGATGTTCACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAG
 TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
 AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
 AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA
 TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTTGCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT
 AA -3'

Fig. 14C-1

Gen c264scTCR-hmt-IL15D8H

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCGTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTC
 CAGGTTCCACCGGTTCAGTCAGTGACGCAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTC
 TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGPATTCCTACTCTGGGACACCT
 TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
 AGTACTATTCAAGGAGACCCAGTGGTTCAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA
 GTTCAGCAAGAGTAACTCTTCCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
 AGCGACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
 TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGACACTAGTGGTGG
 CGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTCGGTGGCGCGGTTCGGCGGTGGCGGT
 TCCTCGAGCAATTCAAAGTCATTCAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC
 AAGGACAAAAAGCAAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
 ATTCTGGTATCAACAAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTTGATTAACTTT
 CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG
 CTGAGTGTCTTCAAACCTCACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGC
 AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTCAGGGGGCGGCACA
 GAAGTTTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA
 AGGTGTTCCCAACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTC
 CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA
 GCACGGACCCGAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATA
 CTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGC
 AACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
 GGACCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTG
 GGGTAGAGCAGACGTTAACGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATCT
 CCACCGTCTCCAACGCGTAACTGGGTGAATGTAATAAGTAAATTTGAAAAAA
 TTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAG
 TGATGTTCAACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTCTTCTCTTGGAG
 TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
 AAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
 AGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACCTGGAGGAAAAAATATTAAGAA
 TTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAATGTTTCATCAACACTTCTTGAT
 AA -3'

Fig. 14C-2

Proteina c264scTCR-hmt-IL15D8A

metdtlllwvlllwvpgstggsvtqpdarvtvsegaslqrcrkysygtpylfwvvyqprqglqllkyyys
 < Péptido señal >< TCR Vα

gdpvvgvngfeaeafsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqliwsgtkliikpdtsgggsgg
 >< conector TCR Vα

ggsgggsgggssnskviqtprylvksggqakarcipekghpvmfyggknnefkflinfqngvlg
 conector >< TCR Vβ

qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseagdsalylcasslsgggtvffgkgrlttvvedlnkvfppevay
 >< TCR Vβ

fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevshgsvtdpqp.kegpaindsryclssrlrvsa
 TCR Cβ

tfwqnpnrnhfrcqvfyglsendewtdrakpvtqivsaaawgradvnepkssdkthtsppttrnwvvi
 TCR Cβ >< conector >

salkkiedliqsmhidatlytesdvhpeckvtamkcfillelqviesgdsahdtvenliilannslssn
 * IL-15 D8A

gnvtesgkeceeeleeknikeflqsfvhivqmifints >
 IL-15 D8A

Fig. 14D-1

Proteína c26-4sc TCR-hmt-IL15D8N

metdtlllwlwlllwpvgstggsvtqpdarvtvsegaelqrcrkysysgtpylfwyvqyprqglqlllkyys
 < Péptido señal : >< TCR V α

gdpvvqgvngfeae fsksnssfhlrkasvhwdsavvfcvlsedsnyqlwgsqtkllikpdtsgggsggg
 TCR V α >< conector

ggsgggsgggsgssnkvigtprylvkqggqkkmrcipekghpvvfwyqqknnefkflinfqngvlg
 conector >< TCR V β

qidmtekrfsaecpsnpsleiqsseagdsalylcasslsgggtevfkgktrltvvedlnkvfppevav
 TCR V β >< TCR C β

fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdpqplkegpalndsryclssrlrvsa
 TCR C β

tfwgnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpytqivsaawgradvnepkssdkthtsppsptnrvnvi
 TCR C β > < conector > <

sllkkiedllqsmhidatlytesdvhpvcvtamkcflllelqvlesgdasindtvenlilannslssn
 * IL-15 D8N

gnvtesgckeceeeleeknikeflqsfvhivqmfints
 IL-15 D8N >

Fig. 14D-2

Clave

- CTLL2 teñida w/péptido p53/reactivo HLA-A2 solo
- CTLL2 teñida w/c264scTCR/hulL15+péptido p53/HLA-A2
- CTL2 teñida w/c264scTCR/hulL15+c264scTCR/hulL15R α Sushi + péptido 053/HLA-A2
- CTLL2 teñida w/c264scTCR/hulL15R α Sushi + péptido p53/HLA-A2

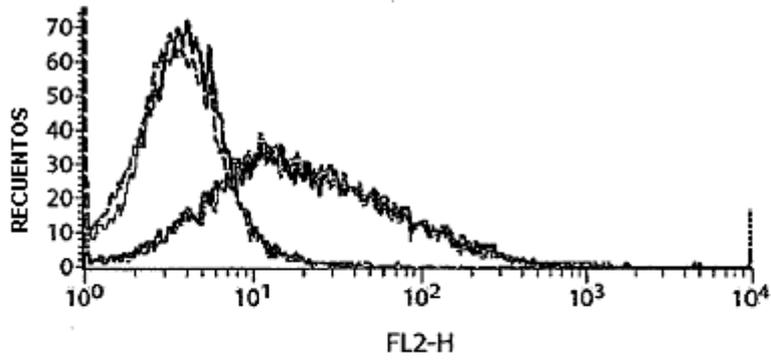


Fig. 15

Análisis de Proliferación de Células CTLL-2 de Actividad IL15

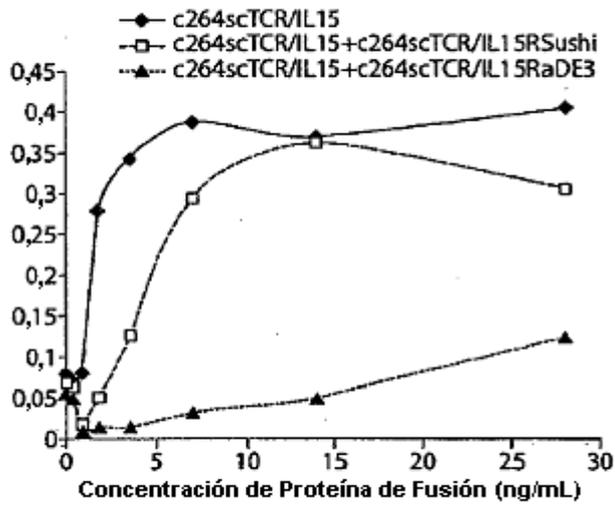


Fig. 16

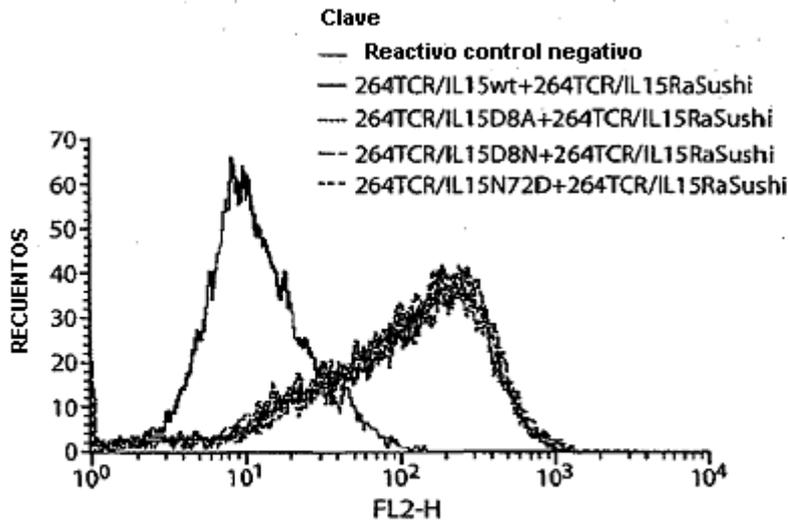


Fig. 17A

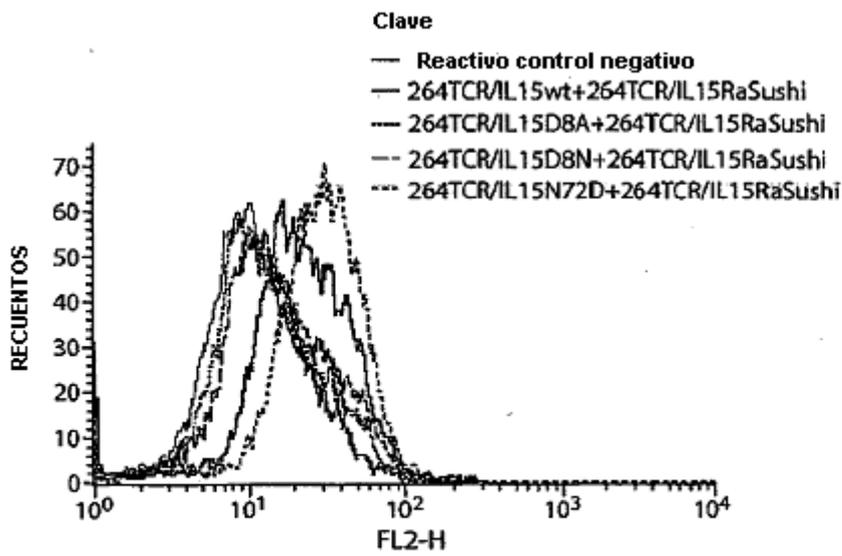


Fig. 17B

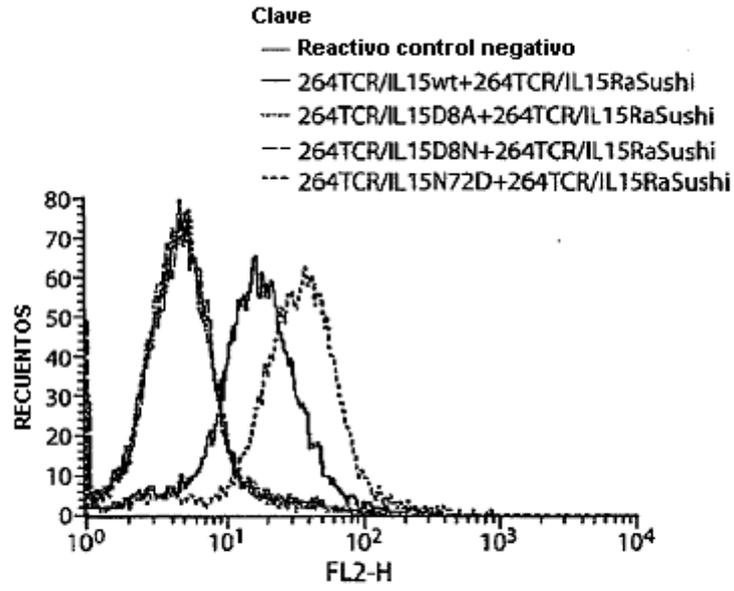


Fig. 17C

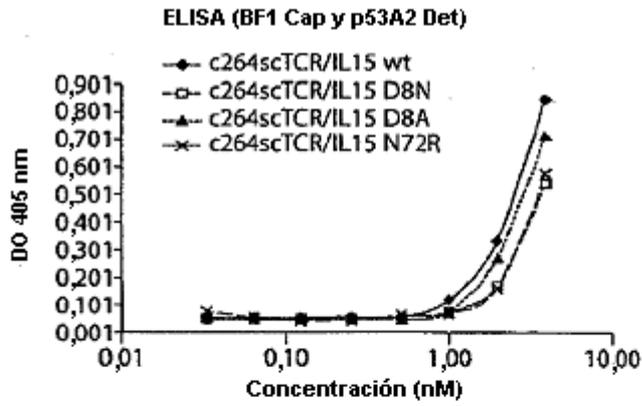


Fig. 18A

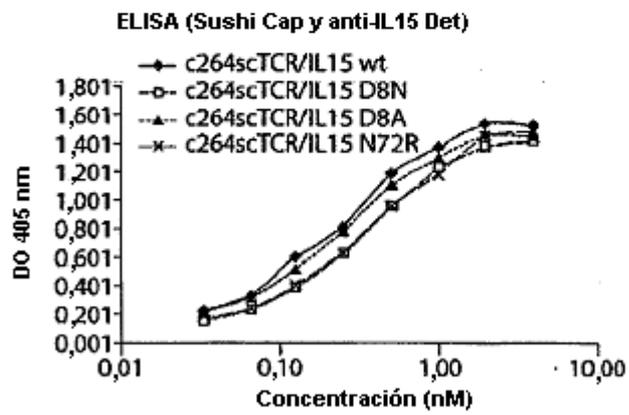


Fig. 18B

Análisis proliferación células CTLL-2

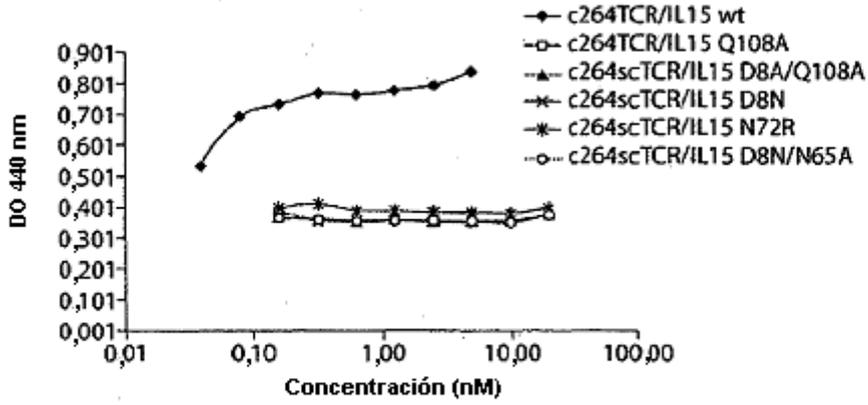


Fig. 19A

Análisis proliferación células 32Db

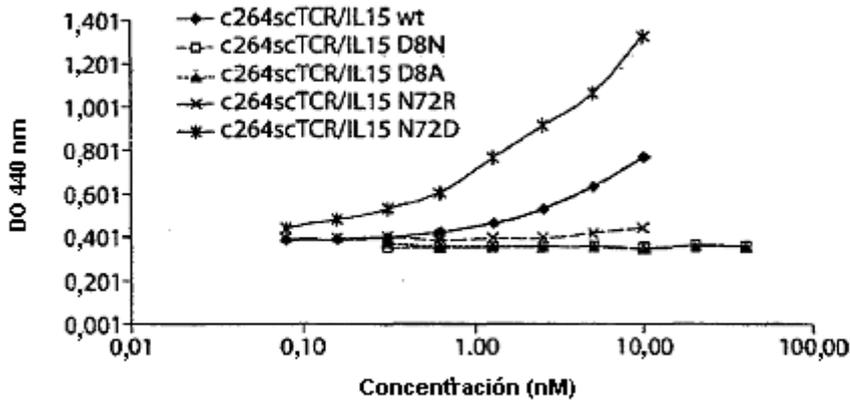


Fig. 19B

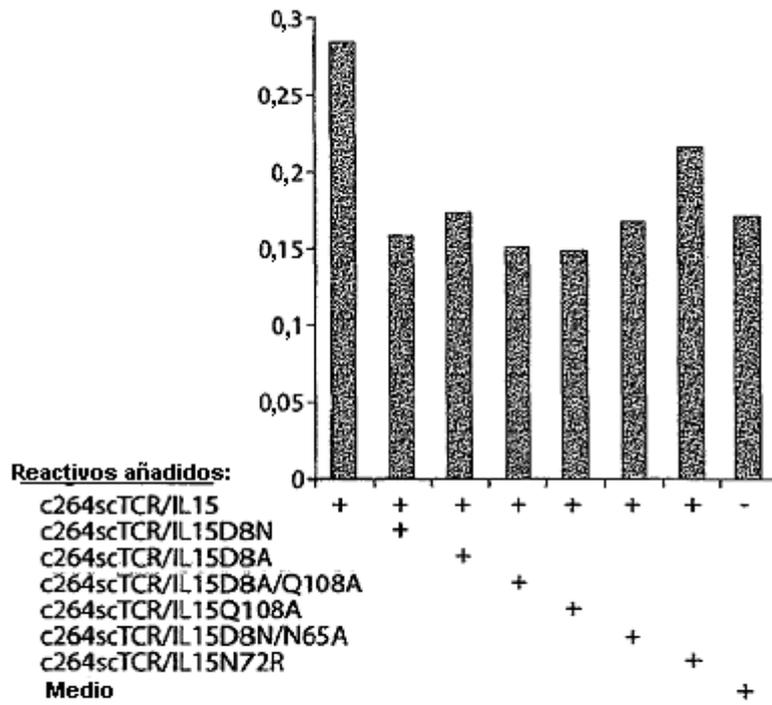


Fig. 19C

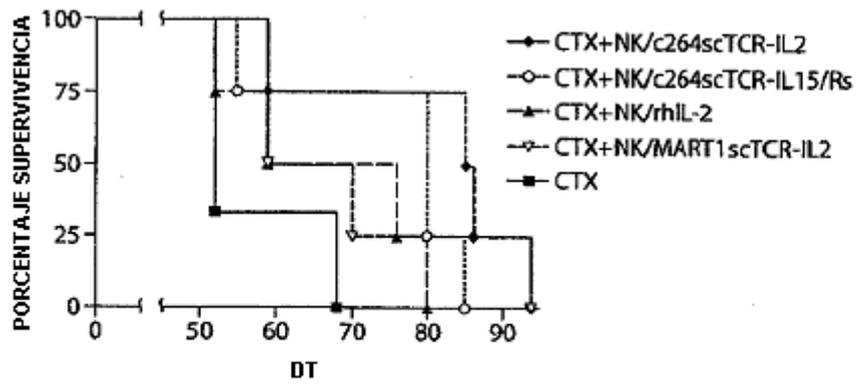


Fig. 20

Tabla 1

Mutantes	Posición	8	61	65	72	108	Unión receptor IL15R β γ C	Unión IL15R α	Actividad proliferación
	WT aa	D	D	N	N	Q	+	+	+
1	8	N					-	+	-
2	8	A					-	+	-
3	61		A				-	+	-
4	65			D			-	+	-
5	65			A			-	+	-
6	72				D		3+	+	3+
8	72				R		-	+	-
9	108					A	-	+	-
10	8+65	N		A			-	+	-
11	8+108	A				A	-	+	-
12	8+65	S		R			-	+	-

Fig. 21

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFILLELQVISLES GDASIH
DTVENLIIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMPINTS

Fig. 22A

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCAT
ATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATG
AAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCAT
GATACAGTAGAAAACTGATCATCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTA
ACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAC TGGAGGAAAAAATATTTAAAGAATTTTG
CAGATTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA

Fig. 22B